

# **Gentechnisches Enzymdesign zur Verbesserung der Eigenschaften von Isomaltulose-Synthase aus *Protaminobacter rubrum***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Susann Baumert  
aus Osterburg

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professor. Dr. Klaus-Dieter Vorlop

apl. Professor Siegmund Lang

19.12.2011

20.04.2012

Druckjahr 2012

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellenverzeichnis.....	iv
Symbol- und Abkürzungsverzeichnis.....	v
1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Palatinose und ihre Eigenschaften.....	3
2.1.1 Verwendung von Palatinose in der Lebensmittelindustrie.....	4
2.1.2 Verwendung der Palatinose als Ausgangsstoff für die chemische Industrie .....	5
2.1.3 Industrieller Herstellungsprozess.....	5
2.2 Das Enzym Isomaltulose-Synthase.....	7
2.2.1 Klassifizierung und Nomenklatur der Isomaltulose-Synthase .....	7
2.2.2 Die Reaktion der Isomaltulose-Synthase.....	7
2.2.3 Isomaltulose-Synthase bildende Mikroorganismen.....	8
2.2.4 Produktselektivität der Isomaltulose-Synthase .....	9
2.2.5 Strukturelle Kenntnisse der Isomaltulose-Synthase.....	10
2.3 Gentechnisches Enzymdesign .....	13
2.3.1 Gerichtete Evolution .....	13
2.3.2 Rationales Proteindesign .....	14
2.3.3 Semirationales Proteindesign.....	15
2.3.4 Screening- und Selektionsmethoden.....	16
2.3.5 Expressionssystem auf Basis von <i>Escherichia coli</i> .....	18
2.4 Thermostabilität von Enzymen .....	19
3 Material und Methoden .....	23
3.1 Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	23
3.1.1 Wirtsstamm JM105.....	23
3.1.2 pMSpal127 .....	23
3.2 Kultivierungsbedingungen.....	24
3.2.1 Verwendete Medien .....	24
3.2.2 Kultivierung in 5-mL-Kulturröhrchen .....	25
3.2.3 Kultivierung im Schüttelkolben .....	26
3.3 Analytik .....	27
3.3.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD <sub>600</sub> ).....	27
3.3.2 High performance liquid chromatography (HPLC) .....	27
3.3.3 Bestimmung der Plasmid-DNA-Menge .....	29
3.3.4 Bestimmung der löslichen Proteinkonzentration.....	30
3.3.5 Semiquantitative Erfassung der Proteine durch SDS-PAGE.....	31
3.4 Zellaufschluss .....	32
3.5 Standard-Enzymaktivität .....	33
3.5.1 Berechnung der Enzymaktivität der Isomaltulose-Synthase .....	34
3.6 Analyse des Produktspektrums der Isomaltulose-Synthase .....	34
3.7 Analyse der Thermostabilität.....	35
3.8 <i>In vitro</i> DNA-Rekombination (Klonierung) zur Herstellung der Deletionsmutanten – SFI und –FIE.....	35
3.8.1 Site-directed Mutagenese von Plasmid-DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	36
3.8.2 Restriktionsverdau mit <i>DpnI</i> .....	37
3.8.3 Ligation der linearen PCR-Produkte .....	38
3.8.4 Herstellung chemo-kompetenter JM105-Zellen .....	38
3.8.5 Transformation durch Hitzeschock .....	38
3.8.6 Identifizierung der Mutanten .....	39
4 Ergebnisse und Diskussion .....	40

---

4.1	Funktionelle Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften der Pall-Enzyme aus den rekombinanten Mutanten.....	40
4.1.1	Screening der besten Kandidaten .....	41
4.1.2	Wachstumsverhalten.....	42
4.1.3	Aufnahme des Produktspektrums.....	43
4.1.4	Temperatureinfluss auf die Pall-Selektivität.....	45
4.2	Deletionsmutanten.....	48
4.2.1	Auswahl der Klonierungsstrategie .....	48
4.2.2	Selektion der Deletionsmutanten.....	49
4.2.3	Auswirkung der Deletionen auf die Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms .....	51
4.2.4	Zusammenfassung: Effekte der Deletionen auf die Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms.....	61
4.3	Substitutionsmutanten.....	63
4.3.1	Deskription der Substitutionsmutanten .....	63
4.3.2	Untersuchung zur Voraussage von Effekten definierter Mutationen in homologen Enzymen.....	67
4.3.3	Auswirkung der Substitutionen auf die Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms .....	71
4.3.4	Zusammenfassung: Effekte der AS-Substitutionen auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms.....	82
5	Zusammenfassung .....	84
6	Schlussfolgerung und Ausblick .....	85
7	Literaturverzeichnis.....	87
8	Anhang .....	98
	Danksagung .....	103

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1	(a) Chemische Struktur der Saccharose; (b) Chemische Struktur der Palatinose.....	3
Abbildung 2-2	Enzymatische Reaktion der Isomaltulose-Synthase nach Zhang et al., 2003 .....	8
Abbildung 2-3	Übereinander gelegte 3D-Struktur der Isomaltulose-Synthase aus (Lipski et al., 2010) .....	11
Abbildung 2-4	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur.....	20
Abbildung 3-1	Genkarte des <i>pall</i> -Expressionsplasmids pMSpal127 .....	24
Abbildung 3-2	Retentionszeiten der Substanzen an HPLC-System 1 .....	28
Abbildung 3-3a	Retentionszeiten am UV-Detektor	
	3-3b: Retentionszeiten am RI-Detektor .....	29
Abbildung 4-1	Auswahl der besten Kandidaten anhand von zellspezifischer Pall-Aktivität im 5-ml-Maßstab .....	41
Abbildung 4-2	Wachstumskurven der Deletionssmutanten .....	42
Abbildung 4-3	Zeitlicher Verlauf des gebildeten Produktspektrums vom Reaktionsstart bis zum vollständigen Substratverbrauch beispielhaft an Zellextrakten aus JMSpal513 .....	44
Abbildung 4-4	Pall-Selektivität der Substitutionsmutanten JMSpal306 und JMSpal513 bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen.....	45
Abbildung 4-5	Klonierungsstrategie zur Herstellung der Deletionsmutanten.....	48
Abbildung 4-6	Ausschnitt der Nukleotidsequenz von Template und linearem PCR-Produkt der jeweiligen Deletionsmutante JMSpalSFI und JMSpalFIE .....	49
Abbildung 4-7	Restriktionskarte des linearisierten Plasmids pMSpal127 und Foto des Agarosegels mit Restriktionsfragmenten nach einem vollständigen Doppelverdau mit <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i> .....	50
Abbildung 4-8	Die partielle Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Deletionsmutanten im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz der Referenz JMSpal127 .....	51
Abbildung 4-9	Relative Pall-Aktivitäten der Deletionsmutanten in Bezug auf die Referenz JMSpal127 .....	52
Abbildung 4-10	Vergleichende Analyse der Pall-Expression und dazugehörige, schematisch dargestellte relative Pall-Aktivitäten.....	54
Abbildung 4-11	Plasmid-DNA aus Deletionsmutanten nach einer Restriktion mit <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i> und elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel....	56
Abbildung 4-12	Pall-Selektivität der Deletionsmutanten im Vergleich .....	57
Abbildung 4-13	Pall-Thermostabilität der Deletionsmutanten .....	59
Abbildung 4-14	Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des Pall-Enzyms aus JMSpal127 und Lokalisierung der eingeführten Mutationen .....	64
Abbildung 4-15	Pall-Raumstruktur und Lokalisierung der erzeugten Punktmutationen ....	66
Abbildung 4-16	Vergleichende Pall-Thermostabilität .....	68
Abbildung 4-17	Vergleichende Analyse der Pall-Selektivität.....	69
Abbildung 4-18	Relative Pall-Aktivitäten der Substitutionsmutanten in Bezug auf die Referenz JMSpal127 .....	72
Abbildung 4-19	Vergleichende Analyse der Pall-Expression und dazugehörige, schematisch dargestellte relative Pall-Aktivitäten .....	74
Abbildung 4-20	Isolierte Plasmid-DNA der Substitutionsmutanten im Doppelansatz A und B .....	76
Abbildung 4-21	Pall-Selektivität im Vergleich.....	77
Abbildung 4-22	Vergleichende Analyse der Pall-Thermostabilität für JMSpal306 und JMSpal513 .....	80

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Produktspektrum des Pall Enzyms aus immobilisierten <i>P. rubrum</i> -Zellen.....	6
Tabelle 2.2	Nomenklatur der Isomaltulose-Synthase .....	7
Tabelle 2.3	Hauptprodukte der Isomaltulose-Synthase verschiedener Bakterien-Stämme .....	9
Tabelle 3.1	Eigenschaften des <i>E. coli</i> Wirtstammes JM105 .....	23
Tabelle 3.2	LB-Medium für die <i>E. coli</i> -Kultivierung .....	24
Tabelle 3.3	YeGly10-Medium für die Pall-Produktion .....	25
Tabelle 3.4	Ampicillin-Stammlösung [50 mg/mL].....	25
Tabelle 3.5	Geräteliste für die Kultivierung im Kulturröhrchen bzw. Schüttelkolben.....	26
Tabelle 3.6	Bestandteile HPLC-System 1 .....	27
Tabelle 3.7	Retentionszeiten HPLC-System 1 .....	28
Tabelle 3.8	Bestandteil HPLC-System 2 .....	28
Tabelle 3.9	Retentionszeiten HPLC-System 2.....	29
Tabelle 3.10	Verwendete Lösungen für die Quantifizierung der Plasmid-DNA.....	30
Tabelle 3.11	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA .....	30
Tabelle 3.12	Bestandteile des DNA-Größenstandards.....	30
Tabelle 3.13	benötigte Lösungen für SDS-PAGE.....	32
Tabelle 3.14	Bestandteile des Protein-Molekulargewichtsmarkers.....	32
Tabelle 3.15	Bestandteile des Reaktionspuffers .....	32
Tabelle 3.16	Geräteliste für die Bestimmung der Pall-Aktivität.....	33
Tabelle 3.17	Substratlösung für die Enzymreaktion .....	33
Tabelle 3.18	Geräteliste zur Herstellung der Deletionsmutanten.....	35
Tabelle 3.19	Nukleotidsequenz der verwendeten Primerpaare und ihre Arbeitskonzentration.....	36
Tabelle 3.20	Phosphorylierungs-Ansatz.....	36
Tabelle 3.21	PCR-Ansatz zur Erzeugung von Deletionsmutanten .....	37
Tabelle 3.22	Angewandtes PCR-Programm zur Herstellung der Deletionsmutanten .....	37
Tabelle 3.23	Ansatz des <i>DpnI</i> -Verdau.....	38
Tabelle 3.24	Ligationsansatz .....	38
Tabelle 4.1	Wachstumsverlauf der Deletionsmutanten im 50-mL-Maßstab .....	42
Tabelle 4.2	Zeitlicher Verlauf des Produktspektrums zur Bestimmung der Enzym- Selektivität .....	44
Tabelle 4.3	Pall-Selektivität bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen .....	45
Tabelle 4.4	Pall-Aktivität der Deletionsmutanten .....	52
Tabelle 4.5	Semiquantitative Auswertung der SDS-PAGE der Zellextrakte aus den Deletionsmutanten bezogen auf den Referenz-Stamm JMSpal127 .....	55
Tabelle 4.6	Pall-Selektivität der Deletionsmutanten im Vergleich.....	57
Tabelle 4.7	Pall-Thermostabilität bei 50 °C .....	59
Tabelle 4.8	Zusammenfassende Darstellung der Effekte der Deletionen auf die Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms .....	62
Tabelle 4.9	Molekulargenetische Charakteristiken der Substitutionsmutanten .....	65
Tabelle 4.10	Die untersuchten Stämme und ihre Mutationen.....	66
Tabelle 4.11	Vergleich der Thermostabilität .....	68
Tabelle 4.12	Pall-Selektivität von <i>Klebsiella</i> - und <i>P. rubrum</i> -Mutanten .....	70
Tabelle 4.13	Pall-Aktivität der Zellextrakte aus den Substitutionsmutanten.....	72
Tabelle 4.14	Semiquantitative Berechnung der Pall-Menge aus SDS-PAGE.....	75
Tabelle 4.15	Pall-Selektivität im Vergleich .....	77
Tabelle 4.16	Pall-Produktspektrum .....	78
Tabelle 4.17	Vergleichende Pall-Thermostabilität der Substitutionsmutanten bei 50 °C .....	79
Tabelle 4.18	Zusammenfassende Darstellung der Effekte der AS-Substitutionen auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms .....	83

# Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Einheit	Bezeichnung
A	-	präexponentielle Faktor
c	g/L	Konzentration
c <sub>Pal</sub>	g/L	Palatinose-Konzentration
E <sub>A</sub>	J/mol	Aktivierungsenergie
EU	μmol/min	Enzymeinheit (engl. <i>enzyme unit</i> )
f	-	Verdünnungsfaktor
k	-	Geschwindigkeitskonstante
MW	g/mol	molare Masse
OD	-	optische Dichte
R	8,314 J/(K*mol)	universelle Gaskonstante
T	°C	Temperatur
T <sub>600</sub>	-	Transmission bei einer Wellenlänge von 600 nm

Aminosäure	Abkürzung	Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Tyrosin	Tyr	Y

Abkürzung	Bezeichnung
<i>ampR</i>	Amp-Resistenzgen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
CAS-Nummer	engl. <i>chemical abstracts service</i> ; internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe
Dal	Dalton
deion.	deionisiert
Del	Deletion
dNTP-Mix	Mix der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate
EC-Nummer	engl. <i>enzyme commission</i> ; numerisches Klassifikationssystem für Enzyme
Fru	Fructose

Abkürzung	Bezeichnung
GH-13	Glycosylhydrolase Familie 13
GI	Glykämischer Index
Glu	Glucose
GRAS	engl. <i>generally recognized as safe</i>
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ins	Insertion
k.A.	keine Angaben
Konz.	Konzentration
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
max.	maximale
Monosac.	Monosaccharide
<i>mutB</i>	codierendes Gen der Isomaltulose-Synthase aus <i>P. mesoacidophilic</i>
OD	optische Dichte
P(LAC)	<i>lac</i> -Promoter
Pal	Palatinose (Isomaltulose)
<i>pall</i>	Isomaltulose-Synthase codierendes Gen
Pall	Isomaltulose-Synthase
phos.	phosphoryliert
RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel
RI	engl. <i>refractive index</i> ; Brechungsindex
RLDLD	Isomerisierungsmotif aus <i>P. rubrum</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i>
Rpm	engl. <i>rounds per minute</i> ; Umdrehungdn pro Minute
RYDRA	Isomerisierungsmotif aus <i>P. mesoacidophilic</i>
Sac	Saccharose
SDS	engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
<i>smuA</i>	codierendes Gen der Isomaltulose-Synthase aus <i>P. rubrum</i>
unphos.	unphosphoryliert
UV	Ultraviolett
YeGly10	Produktionsmedium mit Hefeextrakt und 10 g/L Glycerin
Zellspez.	Zellspezifisch



# 1 Einleitung und Zielsetzung

Palatinose ist ein alternatives Kohlenhydrat, das aufgrund seiner ernährungsphysiologischen Eigenschaften in der Lebensmittelindustrie sehr begehrt ist. Auch auf dem Sektor der nachwachsenden Rohstoffe stellt Palatinose einen Ausgangsstoff für die chemische Industrie dar.

Das industriell interessante Zuckermolekül Palatinose wird nur von einigen wenigen Organismen, wie z.B. *Klebsiella* LX3, *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas mesoacidophila*, *Erwinia rhapontici* oder auch *Protaminobacter rubrum* gebildet. Diese kleine Gruppe von Palatinose-bildenden Bakterien besitzt das Enzym Isomaltulose-Synthase (Pall-Enzym), das für die enzymatische Konversion von Saccharose zu Palatinose verantwortlich ist. Bei der Umsetzung von Saccharose entsteht neben Palatinose ein breites Spektrum an unerwünschten Nebenprodukten, deren Verhältnis von Organismus zu Organismus variiert.

Deutscher Marktführer für die industrielle Herstellung von Palatinose ist die Südzucker AG, bei der der industrielle Prozess mit immobilisierten Zellen von *P. rubrum* weitestgehend optimiert ist. Dennoch liegen die Mengen der unerwünschten Produkte bei 15 % und verteuern den Herstellungsprozess.

Der Einsatz von gentechnisch veränderten Enzymen oder Organismen ist eine Möglichkeit die Effizienz der Palatinose-Herstellung zu steigern.

Leider lassen sich Effekte der gentechnischen Veränderungen nur schwer vorhersagen, so dass die Wirkung der Mutationen durch geeignete Screeningverfahren untersucht werden muss. Die Entwicklung solcher Screeningverfahren ist zeit- und kostenintensiv und muss für die jeweilige Fragestellung individuell angepasst werden.

Das semirationale Enzymdesign bietet die Möglichkeit, aufgrund von Aminosäuresequenzvergleichen homologer Enzyme, die Auswahl der Mutationsstellen einzuschränken. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit Positionen im Gen zu finden, deren Manipulationen einen Effekt auf das Enzym haben.

Durch gezielte genetische Veränderungen am Pall-Enzym können Zusammenhänge zwischen der Struktur des Pall-Enzyms und der Enzym-Selektivität und -Aktivität geklärt werden. Aus diesen Hinweisen können Informationen gewonnen werden, welche Mutation eine Veränderung der Pall-Eigenschaft bewirkt. Neben diesen Eigenschaften kann der Prozess auch durch die Anwendung thermostabiler Pall-Enzyme effizienter werden. Die Gestaltung thermostabiler Enzyme ist aufgrund der vielseitigen Mechanismen, die für eine Thermostabilität der Enzyme verantwortlich sind, schwierig und kaum planbar.

Ein wichtiges Werkzeug zur Durchführung des Enzymdesigns ist die Fremdgenexpression in *E. coli*. Mit ihr kann die Bereitstellung des heterologen Fremdenzyms in ausreichender Konzentration gewährleistet werden.

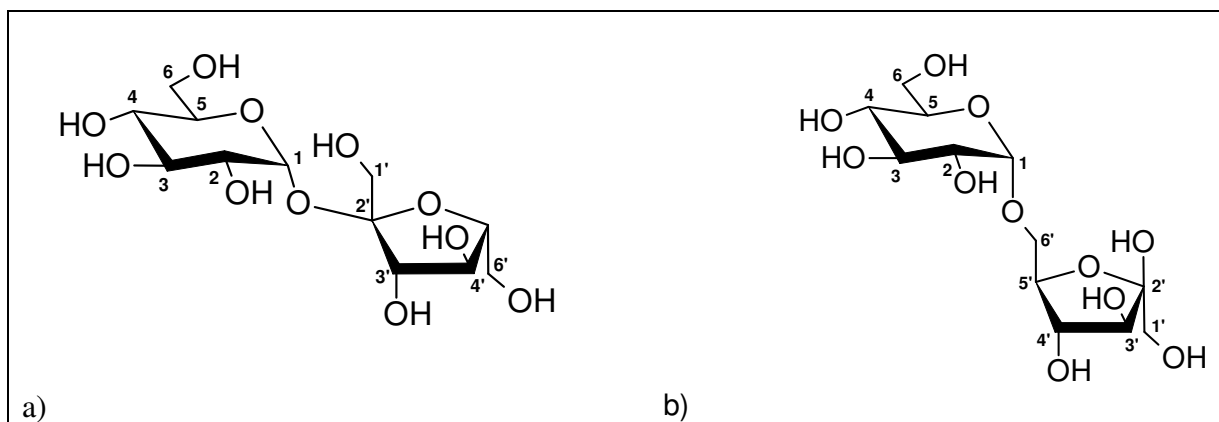
Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms aus *P. rubrum* durch ein semirationales Enzymdesign. Im Fokus stand dabei die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Struktur und Eigenschaft des Pall-Enzyms durch gezielte genetische Veränderungen. Dies beinhaltete die Anwendung zweier unterschiedlicher Mutagenese-Strategien. Zum einen sollten Effekte der Aminosäure-Deletionen an der Schnittstelle zwischen Fusionspeptid und nativem Pall-Enzym untersucht werden. Zum anderen wurden die Auswirkungen von Aminosäure-Substitutionen an gezielten Positionen im Pall-Enzym auf die Eigenschaft des Enzyms untersucht. Die generierten rekombinanten Pall-Mutanten wurden dazu molekulargenetisch und physiologisch charakterisiert.

Gleichzeitig sollte die Übertragbarkeit prognostischer Aussagen über die Auswirkung von Mutationen in homologen Enzymen aus eng verwandten Organismen überprüft werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Palatinose und ihre Eigenschaften

Palatinose<sup>TM</sup>, oder auch Isomaltulose (chemischer Name: 6-O-  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-fructose) besteht aus je einem Molekül  $\alpha$ -1,6 glykosidisch verknüpfter Glucose und Fructose (Schiweck, 1980). Als eines der fünf Strukturisomere der Saccharose kommt dieses reduzierende Disaccharid natürlicherweise in geringen Mengen in Honig (Low et al., 1988) und in zuckerreichen Flüssigkeiten vor (Takazoe, 1989).



**Abbildung 2-1 (a) Chemische Struktur der Saccharose; (b) Chemische Struktur der Palatinose**

Abbildung 2-1 zeigt die chemische Struktur der beiden Disaccharide Saccharose und Palatinose im Vergleich. Die stabilere  $\alpha$ -1,6-Glucose-Fructose-Molekülbindung verleiht Palatinose im Vergleich zur Saccharose, welche über eine  $\alpha$ -1,2-Bindung verfügt, besondere Eigenschaften (Schiweck, 1980).

So steigt der Blutzucker- und Insulinspiegel weniger stark an als bei Saccharose (Lina et al., 2002; West et al., 2011), weshalb Palatinose zu den niedrig-glykämischen Zuckern zählt (Godshall, 2007).

Außerdem ist Palatinose nicht-kariös, da dieses Disaccharid von den Mundbakterien kaum in zahnschmelzangreifende Säuren abgebaut werden kann (Minami et al., 1990). Zusätzlich hemmt Palatinose die Bildung von wasserunlöslichen Glykanen (Hamada, 2002; Ooshima et al., 1983), wodurch die Plaquebildung im Mund deutlich gesenkt wird und die Zähne so vor Kariesbildung bewahrt werden (Matsukubo et al., 2006).

Untersuchungen zur Sicherheit und Verträglichkeit dieses Zuckermoleküls haben ergeben, dass Palatinose nicht mutagen, nicht toxisch (Lina et al., 2002), voll verdaulich (Holub et al., 2010) und im Magen-Darm-Trakt keine Symptome wie Magenschmerzen, Flatulenz oder Diarrhoe (Hamada, 2002; Kawai et al., 1985) hervorruft und damit sehr gut verträglich ist. Auch wurde eine positive Wirkung auf die mentale Konzentrationsfähigkeit publiziert, die sich

nach der Einnahme von Palatinose einstellt (Kashimura et al., 2003; Krastanov et al., 2007), sowie eine bifidogene Wirkung der Darmflora (Nakajima et al., 1989; Sako et al., 1999).

### **2.1.1 Verwendung von Palatinose in der Lebensmittelindustrie**

Aufgrund seiner milden Süße, dem natürlichen Geschmack und seiner bereits beschriebenen Eigenschaften ist Palatinose als alternatives Süßungsmittel (Martä et al., 2008; Matsukubo et al., 2006) vor allem für die Lebensmittelindustrie sehr interessant. So findet Palatinose seine Anwendung in Sport- und Wellness-Getränken (Berry.EN, 2011; Dörr et al., 2005), sowie in Sportlernahrung und funktionellen Milchgetränken. Palatinose wird weiterhin in Süßigkeiten wie z.B. Kaugummi, Schokolade und Backwaren verwendet (Bollinger et al., 1990; Yotka et al., 1994). Als niedrig-glykämischer Zucker mit einer hohen Energielangzeitversorgung kann Palatinose für Diabetiker geeignete Lebensmittel sowie in der klinischen Ernährung für die Gewichtskontrolle in Diätprodukten eingesetzt werden (Brouns et al., 2006; Kneller, 2009). Mittlerweile gibt es zahlreiche Patente, die Palatinose als Lebensmittelzusatz oder Arzneimittelzusatz schützen (Akahoshi et al., 2002; Dörr et al., 2005; Heinz et al., 1999; Kashimura et al., 2003).

Obwohl Palatinose selbst als Zuckerersatzstoff eingesetzt wird, fließt ein Großteil der Palatinose-Produktion in die Herstellung des Zuckerersatzstoffes Palatinit<sup>TM</sup>, auch Isomalt genannt. Palatinit ist ein Zuckeralkohol, der zu gleichen Teilen aus 1-O- $\alpha$ -D-glycopyranosyl-D-sorbitol und 1-O- $\alpha$ -D-glycopyranosyl-D-mannitol besteht (Gau et al., 1979; Schiweck, 1979). Die technische Gewinnung von Palatinit erfolgt in einem 2-Stufen-Prozess, bei der zuerst die bereits erwähnte Palatinose gewonnen wird. Diese wird anschließend mit einem Raney-Nickel-Katalysator zu Palatinit hydriert (Bollinger, 1987; Rose et al., 2002). Als Lebensmittelzusatzstoff wird Palatinit mit der europäischen Zulassungsnummer E 953 für Lebensmittelzusatzstoffe ausgewiesen (Mortensen, 2006). Palatinit hat verglichen mit Palatinose ähnliche Eigenschaften (Rose et al., 2002; Schiweck, 1980). Wie Palatinose besitzt Palatinit einen niedrigen glykämischen Index und wird als zahnfreundlicher Zuckeraustauschstoff bezeichnet (Godshall, 2007). In der Nahrungsmittelherstellung ersetzt Palatinit die Saccharose im Mengenverhältnis 1:1 und unterscheidet sich dadurch wesentlich von Süßstoffen, die einem Produkt lediglich Süße geben. Bei aromatisierten Lebensmitteln verstärkt Palatinit die Aromawirkung (Schiweck, 1980).

Des Weiteren produziert die BENEIO-Palatinit GmbH aus Palatinit den Arzneimittelträgerstoff *galenIQ<sup>TM</sup>*. Auch für andere pharmazeutische Produkte wird Palatinit verwendet (Kunz et al., 1999; Saska et al., 2010)

Palatinit ist weltweit der einzige Zuckeraustauschstoff, der ausschließlich aus gewöhnlicher Saccharose hergestellt wird (Bolhuis et al., 2009).

### 2.1.2 Verwendung der Palatinose als Ausgangsstoff für die chemische Industrie

Als reduzierendes Disaccharid mit einer Ketogruppe kann Palatinose im Gegensatz zur Saccharose selektive Carbonyl-Reaktionen eingehen. So belegen eine Vielzahl an Non-Food-Anwendungen die Eignung von Palatinose als Bulkchemikalie in der chemischen Industrie. Reaktionen wie oxidative Spaltung (Trombotto et al., 2000), katalytische (Kunz et al., 1995; Parpot et al., 2010) und mikrobielle Oxidation (Nollborchers et al., 1994) überführen Palatinose in einen reaktiven Ausgangsstoff. Des Weiteren führt eine reduktive Aminierung zu einem Diamin, einer polyfunktionalen Verbindung mit zwei Amino- und mehreren Hydroxylgruppen. Diese Diamine eignen sich hervorragend als Monomere für die Herstellung zu Polyharnstoffen in Reaktionen wie der Polyaddition (Nollborchers et al., 1994). Diese Polymere können durch ihre neuen Eigenschaften, wie der verbesserten biologischen Abbaubarkeit, Wasserlöslichkeit und auch Hautverträglichkeit viele bedeutende Einsatzgebiete erschließen. So können sie sich unter anderem als biologisch abbaubare Tenside in der Waschmittelindustrie nutzbar machen (Cartarius et al., 2002; Kunz et al., 1997) und können in Bereichen der Kosmetikindustrie (Desai, 1990) eingesetzt werden.

Indem Palatinose funktionalisiert und in chemisch interessante Zwischenprodukte umgewandelt wird, bietet es sich als vielseitiger Synthesebaustein in der organischen Chemie an. Palatinose wird als zuckerbasierender *building block* für die grüne Chemie immer interessanter (Lichtenthaler et al., 2001). Durch die enzymatische Umwandlung in Palatinose gewinnt der in großen Mengen zur Verfügung stehende nachwachsende Naturstoff Saccharose als natürlich nachwachsender Rohstoff in der chemischen Industrie eine immer größere Bedeutung.

### 2.1.3 Industrieller Herstellungsprozess

Da die chemische Synthese von Palatinose sehr aufwändig ist, wurden Biokatalysatoren zur Produktion dieses Zuckers eingesetzt.

Das erste Patent für die Produktion von Palatinose erhielt die Südzucker AG im Jahre 1957 (Weidenhagen et al., 1957b). Erste Prozesse zur Herstellung von Palatinose nutzten lebende freie Zellen. Die Nutzung von lebenden freien Zellen führte allerdings zu hohen Aufreinigungskosten und niedrigen Palatinose-Ausbeuten (Schiweck et al., 1990).

Mit der Entwicklung der Immobilisierungs-Technologie gelang die Etablierung stabiler, kosteneffektiver Prozesse, bei der das Enzym (Kutzbach et al., 1982) als auch ganze Zellen von *Protaminobacter rubrum* (Munir, 1983) immobilisiert wurden.

Bei dem von der Südzucker AG angewandten Verfahren erfolgt die enzymatische Umwandlung von Saccharose zu Palatinose mit Hilfe von ganzen immobilisierten Zellen des Stammes *Protaminobacter rubrum* in einem Festbettreaktor. Der Prozess beginnt mit der

Anzucht der Bakterien. Die Kultivierung erfolgt unter sterilen Bedingungen bei 30 °C und einem pH-Wert von 7,2. Im Anschluss daran werden die ganzen Zellen von *P. rubrum* steril in Calcium-Alginat-Kugeln immobilisiert und in den Reaktor transferiert. Die für die Umsetzung zu Palatinose notwendige Saccharose-Lösung wird steril und mit einem pH-Wert von 6,0 dazugepumpt. Anschließend wird die anfallende Palatinose durch Evaporation und Kristallisation abgetrennt (Rose et al., 2002).

Einen Überblick über das Produktspektrum des Pall-Enzyms von immobilisierten *P. rubrum*-Zellen bei 20 °C gibt Tabelle 2.1.

**Tabelle 2.1      Produktspektrum des Pall Enzyms aus immobilisierten *P. rubrum*-Zellen bei 20 °C**

<b>Produkt</b>	<b>% Trockensubstanz</b>
Palatinose <sup>TM</sup>	79,0 - 84,5
Trehalulose	9,0 - 11,0
Fructose	2,5 - 3,5
Glucose	2,0 - 2,5
Isomaltose	0,8 - 1,5
Saccharose	0,5 - 1,0
Isomelezitose	0,5
Rest	0,7 - 1,5

Quelle: (Rose et al., 2002)

Bei der enzymatischen Umlagerung entstehen neben Palatinose allerdings zu 15 % weitere Zucker. Die Bildung dieser Nebenprodukte ist unerwünscht. Sie verteuern den Herstellungsprozess durch geringere Ausbeuten an Palatinose und höhere Aufarbeitungskosten. Die Weiterentwicklung und Verbesserung bestehender Produktionsprozesse ist eine Möglichkeit die Palatinose-Ausbeute zu erhöhen und somit Produktionskosten zu senken.

Eine weitere Möglichkeit die Effizienz der Palatinose-Herstellung zu steigern, liegt im Einsatz genetisch veränderter Enzyme oder Organismen.

Das Bakterium *P. rubrum* wird heute noch in der gleichen Form verwendet, wie es 1957 isoliert wurde. Genetische Modifikationen am *pall*-Gen mittels Enzymdesign könnten ein Ansatz sein, die Palatinose-Ausbeute zu steigern, indem u.a. die Selektivität verbessert wird.

Palatinose wird im Großmaßstab von der Beneo-Palatininit GmbH, einer Tochtergesellschaft der Südzucker AG, sowie von Mitsui Sugar C. in Japan und Cargill Corp. in den USA produziert (Eggleston, 2008). Weltweit werden jedes Jahr 100.000 t an Palatinose hergestellt (Buchholz et al., 2008).

## 2.2 Das Enzym Isomaltulose-Synthase

### 2.2.1 Klassifizierung und Nomenklatur der Isomaltulose-Synthase

Das Enzym Isomaltulose-Synthase (Pall, EC 5.4.99.11) oder auch  $\alpha$ -Glucosyltransferase ist eine Isomerase und gehört zur Glycosylhydrolase Familie 13 (Davies et al., 1995; Henrissat et al., 1997). Die Familie 13-Gruppe umfasst Enzyme, wie  $\alpha$ -Amylasen und Cyclodextrin Glycosyltransferase, die Stärke abbauen genauso wie Enzyme, die spezifisch andere glykosidische Bindungen spalten, wie z.B.  $\alpha$ -1,6- und  $\alpha$ -1,1-Bindungen (Lipski et al., 2010).

Isomaltulose-Synthase katalysiert die Umwandlung von Saccharose in Palatinose als Hauptprodukt sowie Trehalulose, Glucose und Fructose als Nebenprodukte. Die für die Isomaltulose-Synthase zulässige Nomenklatur ist in Tabelle 2.2 dargestellt.

**Tabelle 2.2 Nomenklatur der Isomaltulose-Synthase**

#### **EC 5.4.99.11 (Isomerase)**

CAS-Nummer	159940-49-5
Reaktionstyp	Isomerisation
Empfohlener Name	Isomaltulose synthase
Systematischer Name	Sucrose glucosylmutase
Synonyme	Sucrose mutase, sucrose isomerase, $\alpha$ -Glucosyltransferase, Isomaltulose synthetase, Trehalulose synthase
Reaktion	Saccharose $\rightarrow$ 6-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-D-fructose
Substrat	Saccharose (1- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-2- $\beta$ -D-fructose)
Produkt	Palatinose (6-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-D-fructose)

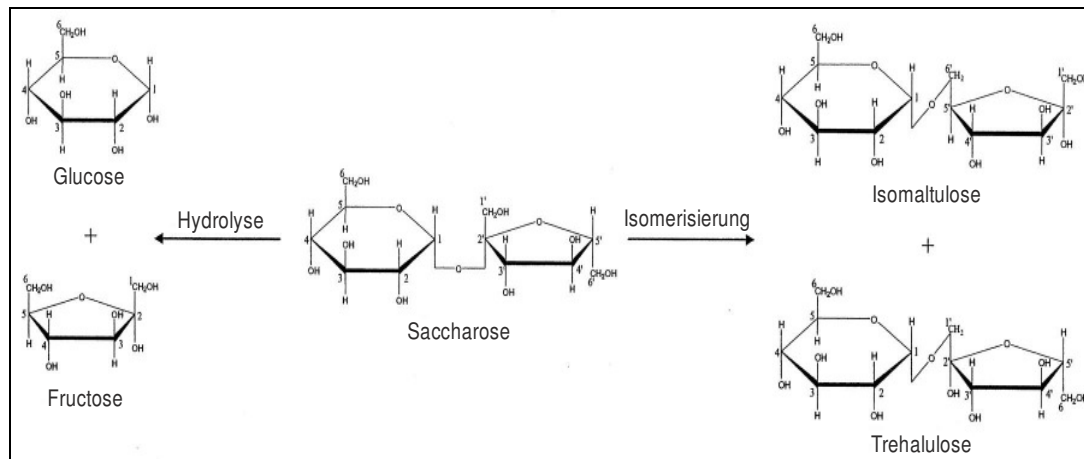
Quelle: Enzym-Datenbank BRENDA, *The Comprehensive Enzyme Information System*

### 2.2.2 Die Reaktion der Isomaltulose-Synthase

Enzyme der Glycosylhydrolase Familie 13 arbeiten alle nach einem 2-Schritt-Reaktionsmechanismus und bilden ein kovalentes Glykosyl-Enzym-Intermediat (Ravaud et al., 2007; Uitdehaag et al., 1999).

Bei dieser Reaktion wird die glykosidische  $\alpha$ -1,2-Bindung der Saccharose hydrolysiert und anschließend in eine  $\alpha$ -1,6-Bindung überführt (Zhang et al., 2002).

Abbildung 2-2 zeigt die enzymatische Reaktion der Isomaltulose-Synthase mit den wesentlichen Produkten.



**Abbildung 2-2 Enzymatische Reaktion der Isomaltulose-Synthese nach Zhang et al., 2003**

Isomaltulose-Synthase besitzt zwei katalytische Aktivitäten in ein und der selben Tasche (Veronese et al., 1999; Zhang et al., 2003a). Durch die Hydrolase-Aktivität entstehen die beiden Monomere Glucose und Fructose, die Isomerase-Aktivität katalysiert die Umwandlung zum Hauptprodukt Isomaltulose und Trehalulose (Park et al., 2007; Ravaud et al., 2008; Veronese et al., 1999; Zhang et al., 2003a).

Allerdings ist der Reaktionsschritt, der die Isomerisierung betrifft bisher eher spekulativ (Lipski et al., 2010). Es wird vermutet, dass der Fructose-Rest von der Saccharose gespalten, der Glucose-Rest mit dem Enzym verbunden bleibt, während für die Bildung von Isomaltulose die Fructose mit der Glucose neu verknüpft wird. Durch die Abspaltung des Fructose-Restes von der aktiven Seite entsteht mit dem Glucose-Enzym-Komplex eine zweite Enzymform, die Glucose oder Wasser binden kann und so schlussendlich weitere Produkte, wie Glucose und Isomaltulose bildet (Lee et al., 2008; Veronese et al., 1999).

### 2.2.3 Isomaltulose-Synthase bildende Mikroorganismen

Nur wenige Mikroorganismen sind in der Lage das Enzym Pali zu bilden. Darunter gehören Bakterien der Gattung *Serratia* (Krastanov et al., 2003; Mcallister et al., 1990), *Erwinia* (Ahn et al., 2003; Cheetham et al., 1982), *Klebsiella* (Huang et al., 1998; Li et al., 2004), *Pseudomonas* (Miyata et al., 1992), *Protaminobacter* (Weidenhagen et al., 1957a), *Pantoea* (Wu et al., 2004) und einige *Enterobacter* spezies (Cho et al., 2007).

Neben diesen bakteriellen Quellen der Isomerase Synthase gibt es auch eine Insektenart, *Bamisia argentifolii*, die ebenfalls dieses Enzym besitzt. Allerdings wird im Gegensatz zu den bakteriellen Isomaltulose-Synthasen einzig und allein Trehalulose hergestellt (Salvucci, 2003).

Es wird vermutet, dass einige Bakterien ein biologisches System entwickelt haben, um Speicherstoffe herzustellen, die ihnen dann als Reserve bei Nährstoffmangel nützt. Durch die Umwandlung von Saccharose haben sich die Isomaltulose-Bildner einen Selektionsvorteil verschafft. Außerdem könnte die Biokonversion von Saccharose eine



Methode sein, um die Kohlenstoff- und Energiequelle Saccharose für andere Mikroorganismen nicht verfügbar zu machen (Bornke et al., 2001; Cheetham et al., 1982; Lehner et al., 2006). Des Weiteren wurde Isomaltulose als wichtiger sogenannter „Osmoprotectant“ bei hyperosmotischen Bedingungen für die Bodenbakterien *Sinorhizobium meliloti* und *Rhizobium sp.* beschrieben (Gouffi et al., 1999).

## 2.2.4 Produktselektivität der Isomaltulose-Synthase

Die Produktverteilung hängt vor allem vom Bakterienstamm ab. *Protaminobacter rubrum* (de Oliva-Neto et al., 2009), *Serratia plymuthica* ATCC 15928 (Veronese et al., 1999), *Erwinia rhapontici* BN 68089 (Ahn et al., 2003) und *Pantoea dispersa* UQ68J (Wu et al., 2005) produzieren hauptsächlich Isomaltulose (73-91 %), während *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (Watzlawick et al., 2009) und *Agrobacterium radiobacter* MX-232 (Nagaimiyata et al., 1993) vermehrt Trehalulose (90 %) produzieren. Die Reaktion der Enzyme wird aber auch von den Reaktionsbedingungen wie pH-Wert und Temperatur beeinflusst, wie in Tabelle 2.3 zusammengefasst ist.

**Tabelle 2.3 Hauptprodukte der Isomaltulose-Synthase verschiedener Bakterien-Stämme**

Organismus	Palatinose [%]	Trehalulose [%]	T <sub>optimal</sub> [°C]	pH <sub>optimal</sub>	Referenz
<i>Erwinia sp.</i> D12	66	kA	35	5,5	(Kawaguti et al., 2010)
<i>Pseudomonas mesoacidophila</i> MX45	8	91	40	5,8	(Watzlawick et al., 2009)
<i>Protaminobacter rubrum</i> CBS574.77	85	8	30	6,0	(de Oliva-Neto et al., 2009)
<i>Enterobacter sp.</i> FMB-1	78	22	50	50 - 6,0	(Cha et al., 2009)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NK33-98-8	77	21	30	6,0	(Aroonannual et al., 2007)
<i>Pantoea dispersa</i> UQ68J	91	3	30 - 35	5,0	(Wu et al., 2005)
<i>Klebsiella sp.</i> LX3	83	12	35	6,0	(Zhang et al., 2002)
<i>Agrobacterium</i> MX-232	10	89	kA	kA	(Nagaimiyata et al., 1993)
<i>Erwinia rhapontici</i> BN 68089	90	kA	30	7,0	(Ahn et al., 2003)
<i>Serratia plymuthica</i> ATCC 15928	73	9	30	6,2	(Veronese et al., 1999)
<i>Klebsiella planticola</i> CCRC 19112	80	15	40	5,0	(Huang et al., 1998)

kA: keine Angaben vorhanden

Im Allgemeinen liegt die optimale Temperatur für die Saccharose Konversion zwischen 30-40 °C.

Eine höhere Reaktionstemperatur steigert die Produktion der Monosaccharide, da die Hydrolyse begünstigt wird, während eine niedrigere Reaktionstemperatur die Menge an Trehalulose erhöht (Nagai et al., 1994; Veronese et al., 1999; Watzlawick et al., 2009; Wu et al., 2005; Zhang et al., 2002). Eine höhere Temperatur macht sich vor allem in dem Fructose-Anteil der Monosaccharide bemerkbar, da die Labilität der Fructose im aktiven Zentrum mit steigender Temperatur zunimmt und so die Freisetzung der Fructose aus dem aktiven Zentrum favorisiert wird (Lipski et al., 2010).

Die Angaben zum optimalen pH-Wert schwanken zwischen 6-7. Zahlreiche Studien belegen, dass ein höherer pH-Wert die Produktion von Trehalulose steigert und im Gegenzug ein niedriger pH-Wert die Produktion von Glucose und Fructose begünstigt (Nagai et al., 1994; Wu et al., 2005; Zhang et al., 2002).

Ravaud et al. (2009) vermuten, dass die Produktspezifität in engem Zusammenhang mit der Ladungsverteilung rund um die katalytische Tasche steht. So könnte eine Veränderung des pH-Wertes die Ladungsverteilung im sowie um das Reaktionszentrum verändern und so die Geometrie des aktiven Zentrums beeinflussen (Lipski et al., 2010).

Die Substratkonzentration (de Oliva-Neto et al., 2009; Kawaguti et al., 2010; Krastanov et al., 2006), die Zusammensetzung des Kulturmediums (Huang et al., 1998; Veronese et al., 1998) und die Immobilisierungsmethode (Kawaguti et al., 2007; Krastanov et al., 2003; Shimizu et al., 1982) sind weitere Parameter die eine Rolle für die Enzymeigenschaften spielen.

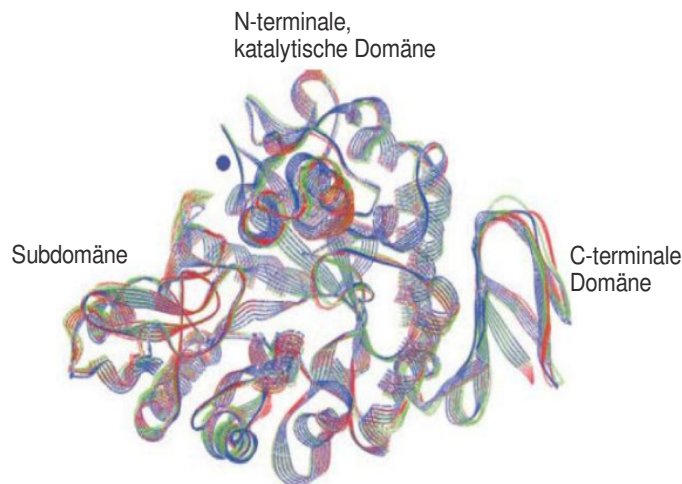
### 2.2.5 Strukturelle Kenntnisse der Isomaltulose-Synthase

Aufgrund der beträchtlichen Unterschiede in der Sequenz und der enzymatischen Eigenschaft gibt es unterschiedliche Namen, um die Isomerase-Synthase-Gene der verschiedenen Organismen zu unterscheiden: *smuA* für *P. rubrum*, *pall* für *Erwinia Klebsiella-Enterobacter*, *sim* für *P. dispersa* und *mutB* für *P. mesoacidophila* (Lee et al., 2008). Isomaltulose-Synthase aus *P. rubrum* weist hinsichtlich der Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung zu 71 % und zu 80 % mit den Enzymen aus *E. rhapontici* und *Klebsiella sp.LX3* auf (Lee et al., 2008).

Das Enzym aus *Protaminobacter rubrum* ist ca. 70 kDal groß und besteht aus 600 Aminosäuren (Schubert persönlich mitgeteilt).

Bisher wurden Studien zur Struktur von Isomaltulose-Synthase aus *Klebsiella sp. LX3* (Zhang et al., 2003a), aus *Protaminobacter rubrum* (Ravaud et al., 2006) und aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (Ravaud et al., 2005a) veröffentlicht. Der Vergleich mit

diesen drei zur Verfügung stehenden 3-D-Strukturen zeigt die gleiche zentrale ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Domäne am N-Terminus und eine ähnliche Architektur des aktiven Zentrums. Diese Domäne liegt zwischen der Subdomäne und der Domäne am C-Terminus und formt den katalytischen Bereich (Ravaud et al., 2009; Zhang et al., 2003a). Abbildung 2-3 zeigt die übereinander gelegte 3D-Struktur der Isomaltulose Synthase nach (Lipski et al., 2010).



**Abbildung 2-3 Übereinander gelegte 3D-Struktur der Isomaltulose-Synthase aus (Lipski et al., 2010)**

MutB in blau, SmuA in rot und Pall in grün.

Neben der möglichen katalytischen Dreiergruppe (Asp241, Glu295 und Asp369) sind Tyr105, His145 und His368 drei weitere Reste die hoch konserviert innerhalb der GH13 vorliegen (Lipski et al., 2010). Charakteristisch für Isomaltulose-Synthasen ist dagegen eine klammerartige Struktur, die von einem Paar Phenylalaninresten (Phe297 und Phe321) gebildet wird und von entscheidender Bedeutung für die Substraterkennung und Reaktionsspezifität ist. Da aber sowohl *mutB* also *smuA* über diese Struktur verfügen, ist sie offenbar nicht der bestimmende Faktor für die Produktverhältnisse von Palatinose und Trehalulose (Ravaud et al., 2009; Ravaud et al., 2007). Außerdem wurde in allen Isomaltulose-Synthasen eine kurze Sequenz identifiziert, die auch als Isomerisierungsmotif bekannt ist.

Für *pall* aus *Klebsiella* wurde diese einzigartige Sequenz, 325RLDRD329, beschrieben, die in der Loop-Region in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum liegt. Diese Region mit den hoch konservierten Aminosäuren könnte die Isomerisierung und die Produktspezifität des Enzyms kontrollieren (Veronese et al., 1999; Zhang et al., 2003b). Die Isomaltulose-Synthasen aus *P. rubrum*, *Erwinia rhapontici* und *Serratia plymuthia* besitzen ebenfalls diese kovalente Sequenz (Li et al., 2011). *mutB* aus *Pseudomonas*, durch die im Gegensatz zu *pall* hauptsächlich Trehalulose gebildet wird, weist mit 311RYDRA315 eine andere entsprechende Sequenz auf (Ravaud et al., 2005b).

Überraschenderweise zeigten (Aroonnu et al., 2007), dass eine Substitution von RLDRD durch RYDRA in *Klebsiella* keinen Effekt auf die Menge an gebildeter Palatinose und Trehalulose hat. Allerdings wurde durch diese genetischen Eingriffe die Enzymaktivität um das 24-fache reduziert.

Ein Vergleich dieser hoch konservierten Sequenz mit der Sequenz anderer Isomaltulose-Synthasen zeigt, dass die beiden Arginin-Reste, 325R bzw. 311R und 328R bzw. 314R, in allen Isomaltulose-Synthase bildenden Mikroorganismen vorkommen. Die Bedeutung dieser beiden basischen Aminosäuren für die Fructosebindung wurde von (Lee et al., 2008) untersucht. Ein Austausch der beiden Arginin-Reste mit Aminosäuren anderer Eigenschaften führte in *P. rubrum* zu einer drastischen Reduzierung der Palatinosebildung und einer vermehrten Produktion der Monosaccharide Glucose und Fructose. Auch in *mutB* wurde der Arginin-Rest durch eine andere Aminosäure ersetzt. R311C veränderte das Produktspektrum von überwiegend Trehalulose (85 %) hin zu den Monosacchariden (79 %), so dass wahrscheinlich hauptsächlich die Hydrolyse anstelle der Isomerisierung abläuft. Es wurde aber auch gezeigt, dass sich das Produktspektrum der *mutB* weitgehend zur Palatinose verschieben lässt, wenn Aminosäuren mit jenen aus Palatinose-bildenden Enzymen ausgetauscht werden (Watzlawick et al., 2009). Des Weiteren wurde klar, dass sich viele der eingeführten Mutationen in unmittelbarer Nähe zu Resten des aktiven Zentrums befinden und scheinbar auch andere Regionen am Produktspektrum mitwirken. Die bestimmenden Faktoren zur Produktspezifität der Isomaltulose-Synthase sind somit sehr fein differenziert. Bisher stellen 3D-Strukturen und die Mutagenesestudien nur eine Basis zur Aufklärung der Produktspezifität dar.

Da sich die Palatinose-bildenden Enzyme in Struktur und Funktion sehr ähnlich sind, rücken allerdings vermehrt Aminosäuren als Kandidaten in den Fokus, die in dieser Klasse der Enzyme nicht konserviert sind.

Wie bereits in Abschnitt 2.1.3 erwähnt, wird das Produktspektrum nicht nur von den Reaktionsparametern Temperatur und pH-Wert beeinflusst, sondern auch durch die Pall-bildenden Mikroorganismen (Ravaud et al., 2006). Für eine industrielle Anwendung sollte die ideale Isomaltulose-Synthase eine vollständige Konversion und eine hohe Spezifität bei hohen Substratkonzentrationen zeigen (Ravaud et al., 2008; Watzlawick et al., 2009).

## 2.3 Gentechnisches Enzymdesign

Während Enzyme in der Natur nahezu perfekt angepasst sind, genügen sie oft nicht den Anforderungen für industrielle Anwendungen. Eine zu geringe Aktivität, Selektivität oder Stabilität macht Enzyme oft unattraktiv oder unrentabel für industrielle Prozesse. Eine Möglichkeit diese Einschränkungen zu überwinden, stellt das Protein-Engineering bzw. Enzymdesign dar. Beim Protein-Engineering wird eine gewünschte Eigenschaft des Proteins durch Manipulation am Enzym selbst verändert. Mit den modernen gentechnischen Verfahren ist es so möglich, ganz gezielt spezifische Veränderungen einer DNA-Sequenz vorzunehmen und Enzyme u.a. als Biokatalysatoren in der chemischen und pharmazeutischen Industrie einzusetzen. Den größten Anteil (~ 65 %) nehmen dabei die hydrolytischen Enzyme wie Lipasen, Esterasen und Proteasen ein, die ihren Einsatz in der Textil-, Papier- und Zellstoffindustrie, sowie der Waschmittelindustrie finden (Powell et al., 2001, Johannes et al., 2006). Aber auch Enzyme aus anderen Enzym-Klassen können auf diese Weise adaptiert werden.

Hierbei unterscheidet man zwei grundsätzliche Prinzipien:

Zum einen wird die Methode der gerichteten Evolution angewendet, welche dem natürlichen Evolutionsprinzip aus zufälliger Mutation und anschließender Selektion nachempfunden ist. Dem gegenüber steht das rationale Proteindesign, bei dem auf Basis detaillierter Struktur- und Funktionsanalysen computer-gestützte, gezielte Mutationen am Enzym vorgenommen werden. Die Kombination aus den beiden generellen Methoden wird als semirationales Enzymdesign bezeichnet.

### 2.3.1 Gerichtete Evolution

Die Natur hat ihre Enzyme im Laufe von Millionen Jahren durch natürliche Evolution optimiert. Sie beruht auf der Anpassung an die sich ständig ändernde Umwelt mittels Zufallsmutation und Genrekombination. Die Gerichtete Evolution ahmt die Gesetzmäßigkeiten der Darwinschen Evolution- Mutation und Selektion- nach, um Enzyme mit verbesserten Eigenschaften zu erzeugen (Drepper et al., 2006; Zocher et al., 2001).

Die Schlüsselschritte bestehen aus: Generierung einer Bibliothek genetisch veränderter Varianten und Screening oder Selektion nach verbesserten Varianten (Marienhagen et al., 2009). Dazu werden die für verbesserte Enzyme codierenden Gene isoliert und einer neuen Runde der Gerichteten Evolution unterzogen. Dieser zyklische Prozess kann beliebig oft wiederholt werden, wodurch bereits nach der 2.Runde ein evolutionärer Druck hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft ausgeübt wird.

Mit Hilfe der gerichteten Evolution, konnten Enzymeigenschaften, wie Enzymaktivität (Olsen et al., 2000; Varadarajan et al., 2008), Lösungsmittelstabilität (Hao et al., 2004),

Enantioselektivität (Reetz et al., 1997), Thermostabilität (Zhao et al., 1998) oder Substratspezifität (Zhang et al., 1997) erfolgreich bearbeitet werden.

### **2.3.2 Rationales Proteindesign**

Die Gerichtete Evolution ist zwar anspruchslos in Bezug auf Informationen über das Zielprotein, dennoch ist es auch ein blinder Prozess (Barak et al., 2008). Mit ihr werden riesige Bibliotheken zufällig mutierter Varianten erzeugt, und die große Herausforderung ist die Durchsuchung dieser großen Anzahl unterschiedlicher Varianten nach der einen Verbesserten. Dem gegenüber steht die Möglichkeit des rationalen Proteindesigns.

Die wachsende Datenvielfalt (Bohm, 1996) und der Fortschritt in der Computertechnik machen es möglich, auch aus rein rationalen Ansätzen maßgeschneiderte Enzyme herzustellen. Besonders die Entwicklung und Verbesserung von Computer Programmen zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen (Dandekar et al., 1992; Koch et al., 1992) und die Sammlung und Bereitstellung von DNA-Sequenzen in Datenbanken (Aldhous, 1993; Eccles et al., 1990; Koh et al., 2003) hat einen enormen Beitrag geleistet. Des Weiteren wurde durch die Entwicklung genetischer Algorithmen die Möglichkeit geschaffen, Strukturvorhersagen zu treffen und so Regeln aufzustellen, die zum Verständnis der Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehung beitragen (Wolfson et al., 2005). Die rechengestützten Werkzeuge zum Proteinengineering sind vielfältig, denn es gibt mittlerweile viele verschiedene Programme, wie z.B. Orbit (Dahiyat et al., 1996; Yosef et al., 2009), Caver (Petrek et al., 2006), Dezymer (Hellinga et al., 1991) oder Rosetta (Zanghellini et al., 2006), die sich mit unterschiedlichen Fragestellungen beschäftigen (Damborsky et al., 2009). Mit der Proteinstrukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie wurde ein Werkzeug geschaffen, die atomare Raumstruktur von Proteinen zu bestimmen. Erst auf diese Weise lässt sich die Funktionsweise der einzelnen Proteine erkennen (Oschkinat et al., 1994).

Im Wesentlichen generiert und analysiert man beim rationalen Proteindesign durch eine positionsgerichtete Mutagenese meist nur eine oder wenige Proteinvarianten.

Rein rationale Ansätze des Enzymdesigns lassen die Bereitstellung kostenintensiver Computertechnologien nötig werden. Sowohl die Einrichtung als auch die Durchführung Computer-gestützter Analysen sind zeitaufwändig. Außerdem muss jede Computer-basierte Enzymvariante im Experiment bestätigt werden. Des Weiteren lässt es sich oftmals nicht vermeiden, diese computerdesignten Konstrukte einigen Runden der gerichteten Evolution zu unterziehen, um eine Feinabstimmung der Struktur oder der katalytischen Effizienz zu erreichen (Damborsky et al., 2009).

### 2.3.3 Semirationales Proteindesign

Mutationen, die aus der gerichteten Evolution hervorgehen sind so vielfältig und dennoch bewirken aus dieser riesigen Auswahl nur einige wenige eine verbesserte Variante. Das rationale Design benutzt Algorithmen, um Mutationen und damit Veränderungen im Enzym vorherzusagen. Dennoch sind es nur Näherungen und eine erfolgreiche Enzymverbesserung lässt sich nur im Experiment erzielen.

Die Kombination aus Informationen über Struktur und Reaktionsmechanismus eines Proteins mit den Methoden zur Generierung einer Mutantenbibliothek machen es möglich, intelligent-erzeugte Bibliotheken zu erstellen. Nicht mehr die Quantität, vielmehr die Qualität der Bibliotheken steht immer mehr im Vordergrund (Kourist et al., 2009). Für das semirationale Proteindesign werden die vorhandenen struktur- oder sequenzbasierten Informationen genutzt, um Mutationen in bestimmten Bereichen des Enzyms einzubauen und somit eine Diversität gezielt in gewisse Regionen zu generieren (Bloom et al., 2005). In vielen Fällen ist es einfach nicht nötig, das komplette Enzym einer Mutagenese zu unterziehen. Das macht die Bibliotheken kleiner und effizienter.

Die zielgerichtete oder auch ortsspezifische Mutagenese (site-directed) bietet die Möglichkeit an bestimmten, vorher ausgewählten Stellen Veränderungen einzuführen (Hemsley et al., 1989). Diese zielgerichteten Mutagenesen umfassen die Einführung von gezielten Punktmutationen, Mutagenesen von multiplen Basen und Deletionen oder Insertionen einzelner Basen und Aminosäuren (Sailen Barik, 1995).

Mit der ortsspezifischen Sättigungsmutagenese kann eine vorgegebene Aminosäure gegen alle 19 verbleibenden Aminosäuren ausgetauscht werden. Konnte z. B. mittels rationalem Proteindesign Aminosäuren eine bestimmte Funktion bzw. Schlüsselrolle im Enzym zugeordnet werden, macht es oftmals Sinn nicht nur an dieser Position die Aminosäure zu variieren, sondern unmittelbar benachbarte Positionen gleich mit (Bartsch et al., 2008). Die sogenannte simultane Sättigungsmutagenese erlaubt die Variierung nahegelegener Aminosäuren. Diesem Ansatz sehr ähnlich ist die iterative Sättigungsmutagenese. Hier wird die Mutagenese auf relevante Stellen des Proteins fokussiert, welche aus 1, 2 oder 3 Aminosäurepositionen bestehen können. In iterativen Zyklen geht man Position für Position ab, wobei das mutierte Gen einer verbesserten Variante als Template für eine weitere Sättigung an einer anderen Position dient (Reetz et al., 2006a). Bekannteste Beispiele der iterativen Sättigungsmutagenese sind der *combinatorial active-site saturation test* (CAST) und der *B-factor iterative test* (B-FIT). Mit CASTing wurde eine systematische Methode entwickelt, die eine planmäßige Berücksichtigung aller Aminosäurepositionen erlaubt, die die Bindungstasche umgeben (Reetz et al., 2005; Carballeira et al., 2007; Sandstrom et al., 2009). Die B-FIT-Methode basiert auf der Verwendung von B-Faktoren, die durch eine

Röntgenstrukturanalyse zugänglich sind und wird vor allem zur Erhöhung der Thermostabilität angewendet (Reetz et al., 2006b; Jochens et al., 2007). Neben diesen Computerprogrammen wurden weitere Programme genutzt, z.B. SCHEMA (Voigt et al., 2002), ProSAR (Fox et al., 2007; 2008) und GLUE-IT und PEDEL-AA (Firth et al., 2008) um die Qualität der Variantenbibliothek zu maximieren und damit den Screeningaufwand zu minimieren.

Während mit der Gerichteten Evolution eher Mutationen generiert werden, die weit entfernt vom aktiven Zentrum liegen, konzentrierte sich das rationale Proteindesign vornehmlich auf Mutationen um das aktive Zentrum bzw. die Bindungstasche herum. Mit beiden Methoden konnten in der Enzymverbesserung Erfolge und Misserfolge erreicht werden (Morley et al., 2005). Einen neueren Ansatz postulierten Wu et al., 2010. Sie suchten mit Hilfe der Kristallstruktur rational nach Domänen im Enzym, an denen Mutationen eine Konformationsänderung bewirken und so zu einer Neugestaltung der Bindungstasche führen. Somit wurde gezeigt, dass auch Mutationen an ferngelegenen Orten Einfluss auf das aktive Zentrum haben und verbesserte Enzymeigenschaften erreichen.

Ein weiterer semirationaler Ansatz ist der Aminosäuren-Sequenzvergleich verwandter Enzyme, um so Unterschiede und somit auch Ansatzpunkte für möglicherweise erfolgreiche Mutationen zu erkennen. Dieser Ansatz konnte zur Verbesserung der Thermostabilität von Enzymen erfolgreich angewendet werden (Perl et al., 2000). Wie bereits in Kapitel 2.2.5 erläutert, kann ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen verwandter Isomaltulose-Synthasen genutzt werden, Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der AS-Sequenz zu erkennen und bietet so die Möglichkeit die Auswahl der Mutationsstellen einzuschränken.

Mit der Anwendung von semirationalem Design ist die gerichtete Evolution nicht mehr rein zufällig, sondern fokussierter; die Variantenbibliotheken werden kleiner. Das erspart Zeit und Kosten, die sonst für das Durchsuchen der riesigen Variantenbibliotheken verwendet wurden.

### **2.3.4 Screening- und Selektionsmethoden**

Alle drei Methoden zur Generierung einer Variantenbibliothek setzen sich auch aus der anschließenden Durchmusterung dieser Bibliothek mittels geeignetem Screening- oder Selektionssystem nach Varianten mit verbesserten Eigenschaften zusammen.

Neben der Generierung der Vielfalt entscheidet die Entwicklung von Durchmusterungssystemen über den Erfolg gerichteter Evolutionsexperimente (Arnold et al., 1999). Nach dem Motto: „You get, what you screen for“ sollte möglichst genau nach der zu verbessernden Eigenschaft gesucht werden (You et al., 1996).



Für das Screening einer Mutantenbibliothek werden zumeist die Klone in Mikrotiterplatten kultiviert und dann mittels photometrischer oder fluorimetrischer Methode auf eine bestimmte, gesuchte Eigenschaft untersucht (Turner, 2003). Je nach Fragestellung können üblicherweise so bis zu  $10^6$  Varianten untersucht werden. Generell erfordern Screeningstrategien eine aktive Untersuchung aller in der Bibliothek vorhandenen Varianten (Taylor et al., 2001). Im Falle sehr großer Bibliotheken entstehen so empfindliche Screeningprobleme.

Ein größerer Durchsatz ist durch die Selektion gegeben. Die *in vivo*-Selektion ist eine Möglichkeit. Hierbei wird ein künstlicher Selektionsdruck aufgebaut, dem nur die Varianten widerstehen können, die eine gewünschte Eigenschaft aufweisen. So treten uninteressante Varianten gar nicht erst in Erscheinung.

Vorraussetzung ist die Kopplung von Genotyp, in Form von DNA oder RNA, mit dem Phänotyp, in Form des Enzyms (Leemhuis et al., 2005). Die Nutzung von Antibiotika-Resistenz-Genen bei der Transformation rekombinanter Plasmide ist eine der ältesten Arten der direkten Selektion (Dean, 1981; Gryczan et al., 1982). Nach diesem sehr wirkungsvollen ersten Selektionsschritt, bleibt die Aufgabe, die Klone zu identifizieren, welche eine verbesserte Enzymvariante enthalten. Auch Wachstumsassays sind gängige *in vivo* Selektionen. Nur solchen Organismen wird das Überleben ermöglicht, die z.B. bestimmte Bestandteile im Medium tolerieren oder definierte Kultivierungsbedingungen akzeptieren.

Display-Methoden, wie das Plasmid- (Gates et al., 1996), das Phagen- (Smith, 1985; Smith et al., 1997), bacterial- (Daugherty et al., 1998) und Yeast-Display (Boder et al., 1997) sind ebenfalls Methoden, durch die verbesserte Enzymvarianten aus großen Bibliotheken selektiert werden können. Allerdings werden sie durch die Expressionssysteme und durch die Transformation limitiert. Offensichtlich wird die Größe der Bibliothek durch die Transformationsfrequenz bestimmt (Leemhuis et al., 2009), wobei eine typische *E. coli* Bibliothek von etwa  $10^{10}$  das obere Limit darstellt (Hanahan et al., 1991; Hocker, 2008).

Mit der Entwicklung von *in vitro*-Selektionssystemen ist keine Transformation mehr notwendig, was die Bibliothekengröße auf bis zu  $10^{14}$  Varianten anwachsen lässt (Lamla et al., 2001). Das Ribosomen- (Hanes et al., 1997) und mRNA-Display (Roberts et al., 1997; Seelig et al., 2007) sind reine *in vitro* Systeme zur Selektion. Eine weitere Möglichkeit der *in vitro* Selektion ist die Kompartimentierung durch Wasser-in-Öl-Emulsionen (Tawfik et al., 1998).

Nicht nur die Enzyme unterliegen einer Evolution, sondern auch die Technologie selbst. So entstanden, wie oben beschrieben, eine Reihe verschiedener Methoden zur Generierung von Variantenbibliotheken. Auch die Möglichkeiten, diese geschaffene Vielfalt an Proteinen zu durchmustern, wurden in den letzten Jahren modernisiert. Der Einsatz von Roboter und

Durchflusszytometer (Daugherty et al., 2000; Varadarajan et al., 2008) ermöglichen heutzutage ein robotikgesteuertes vollautomatisches Screening, dem Hoch-Durchsatz-Screening (high-throughput screening). Fluorogene Substrate und die Nutzung von Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) lassen die Analyse und Sortierung von  $>10^7$  Ereignissen pro Stunde zu (Aharoni et al., 2005).

Obwohl es eine große Entwicklung in der Selektions- und Screeningmethodik gibt, können einige Fragestellungen mit diesen Hilfsmitteln nicht beantwortet werden. Die Konversion eines Oligosaccharides in ein anderes beispielsweise steht vor so einem Problem. Die Etablierung eines eigens dafür ausgerichteten Screeningsystems wäre zu aufwändig, sowohl zeit- als auch kostenbetreffend. Für die Unterscheidung unterschiedlicher Di- und Monosaccharide wird das HPLC-System eingesetzt. Die HPLC ist die genaueste, empfindlichste und zuverlässigste Methode, um verschiedene Zucker nachzuweisen (Park et al., 2007). Denn die Selektion nach dem Vorhandensein der Isomaltulose-Synthase allein lässt nicht auf die Selektivität dieses Enzyms schließen. Aufgrund dieser Problematik ist es notwendig, jede Variante bzw. Mutante einzeln aktiv zu untersuchen. Dazu ist eine zeitraubende Handarbeit, bestehend aus Zellkultivierung, -aufschluss, Enzymreaktion und HPLC-Analyse, erforderlich.

Aufgrund dieser Selektions-Schwierigkeiten ist es daher sinnvoll, ein semirationales Enzymdesign zur Verbesserung der *Pall*-Selektivität anzuwenden. Indem nur an vorher gut ausgewählten Positionen im *pall*-Gen Mutationen vorgenommen werden, entsteht eine kleine Varianten-Bibliothek. Verbesserte Varianten lassen sich dadurch bereits durch ein Screeningverfahren per HPLC erfassen.

### **2.3.5 Expressionssystem auf Basis von *Escherichia coli***

Einen weiteren wichtigen Bestandteil des Protein-Engineering stellt die Expression der zuvor mutierten Gene eines Proteins in einem geeigneten Wirtsorganismus dar. Mikrobielle Enzyme werden von ihrem Wildtyporganismus meist in unzureichender Konzentration produziert. Die Wirtschaftlichkeit eines Enzyms für den industriellen Prozess hängt jedoch unter anderem auch von der Verfügbarkeit dessen in aktiver Form ab.

Die heterologe Expression ist die Expression eines „fremden“ Gens in einem Wirtsorganismus. Generell lassen sich prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme unterscheiden (Yin et al., 2007). Aufgrund der breiten Anwendungsmöglichkeiten und der geringen Kosten eignen sich bakterielle Systeme hervorragend für die heterologe Expression (Terpe, 2006). Der am häufigsten eingesetzte bakterielle Wirt ist *Escherichia coli*.

Das gram-negative Enterobakterium ist in seiner Genetik und Physiologie sehr gut charakterisiert und findet weitverbreitete Anwendung in der industriellen und pharmazeutischen Industrie (Schmidt, 2004; Terpe, 2006). Neben seiner kurzen Generationszeit und einfachen Handhabung zeichnet sich *E. coli* durch seine relative Anspruchslosigkeit an Kulturmedien aus, was sich positiv auf die Kosten der Produktionsprozesse auswirkt (Hockney, 1994; Schmidt, 2004). In *E. coli* können rekombinante Proteine auf mehr als 20 % des gesamten zellulären Proteins angereichert werden (Schmidt, 2004).

Die heterologe Expression in *E. coli* ermöglicht jedoch keine posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierung oder Disulfidbrückenbildung und keine Sekretion der Proteine (Choi et al., 2004; Yin et al., 2007). Die Sekretion ins Medium wird durch die äußere Membran gram-negativer Bakterien verhindert, wodurch rekombinante Proteine entweder im Cytoplasma oder im periplasmatischen Raum akkumuliert werden (Terpe, 2006). So müssen die Bakterien durch eine enzymatische, chemische Behandlung oder durch mechanischen Zellaufschluss vollständig oder partiell lysiert werden (Choi et al., 2004; Jonasson et al., 2002). Zusätzlich können hohe Expressionsraten zur Bildung unlöslicher Einschlusskörper, so genannter inclusion bodies, führen (Sorensen et al., 2005), die eine Denaturierung und Rückfaltung der Proteine notwendig machen.

Im Laufe der Jahre wurden eine Reihe von Strategien entwickelt, um diese Probleme zu lösen. So sind heute eine große Anzahl an *E. coli*-Expressionssystemen erhältlich (Jonasson et al., 2002; Yin et al., 2007). Dennoch gibt es kein universelles System, das für jedes rekombinante Gen eine optimale Expression ermöglicht.

Viele der bisher veröffentlichten Enzymcharakterisierungen und Mutationsstudien zu Isomaltulose-Synthase nutzten das Expressionssystem *E. coli* (Cha et al., 2009; Lee et al., 2008; Ravaud et al., 2006; Wu et al., 2005; Zhang et al., 2003b; Zhang et al., 2003a).

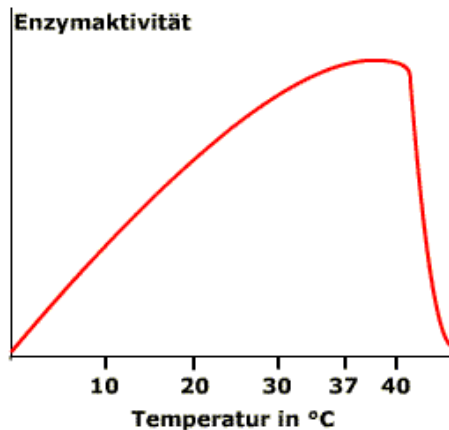
## 2.4 Thermostabilität von Enzymen

Enzyme sind hocheffektive, leistungsstarke und meist hochspezifische Biokatalysatoren.

Enzyme müssen so konzipiert sein, dass sie in ihrer natürlichen Umgebung auf der einen Seite stabil sind, um ihre Struktur aufrecht zu erhalten. Auf der anderen Seite müssen sie flexibel genug bleiben, um konformationelle Änderungen während des Katalyseprozesses zu ermöglichen.

Die Enzymaktivität steigt mit der Temperatur entsprechend der RGT-Regel (Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel) an. Diese besagt, dass eine Erhöhung der Temperatur um 10 °C die Geschwindigkeit der Reaktion in etwa verdoppelt. Dies gilt jedoch nur für einen begrenzten Temperaturbereich (Bisswanger, 2000). So besitzt jedes Enzym

neben dem pH- auch ein Temperaturoptimum, bei dem das Enzym seine größte Aktivität entfaltet.



**Abbildung 2-4 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur**

Quelle: [www.chemgapedia.de](http://www.chemgapedia.de)

Der Plot des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten und dem reziproken Wert der Temperatur zeigt einen linearen Zusammenhang (Arrhenius, 1889).

$$\ln k = \ln A - E_a/RT$$

**Formel 2-1**

k: Geschwindigkeitskonstante

A: präexponentieller Faktor

$E_a$ : Aktivierungsenergie [ $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

R: universelle Gaskonstante [ $8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

T: Temperatur [K]

Dies bedeutet, dass alle Reaktionen in thermophilen Organismen schneller ablaufen als in mesophilen.

Als thermostabil wird ein Enzym bezeichnet, wenn es die Fähigkeit besitzt auch bei höheren Temperaturen einer Denaturierung zu widerstehen (Morley et al., 2005) und damit auch bei höheren Temperaturen aktiv zu bleiben. Unter physiologischen Bedingungen liegt ein Protein in seinem nativen Zustand, der wohl definierten dreidimensionalen Konformation, vor. Werden diese Bedingungen geändert, kommt es zu einer Entfaltung, die als Denaturierung bezeichnet wird.

Der Einsatz von thermostabilen Enzymen in einem industriellen Prozess hat den Vorteil, dass der gesamte Prozess bei höheren Temperaturen ablaufen kann und damit die Gefahr der mikrobiellen Kontamination verringert wird. Weitere Effekte der Prozessführung bei höheren Temperaturen sind die niedrigere Viskosität, bessere Transportraten und die bessere Löslichkeit des Substrates (Bruins et al., 2001). Das senkt die Kosten für Pumpen, Filtrieren und Zentrifugieren. Für enzymatische Prozesse bringen höhere Temperaturen aber auch einen entscheidenden Nachteil mit sich. So geht oft die Selektivität des Enzyms verloren und mehr Nebenprodukte werden gebildet (Bruins et al., 2001).

Um die Thermostabilität eines Enzyms zu verbessern, haben sich einige Methoden als erfolgreich erwiesen. 1. Das rationale Design, das auf der 3D-Struktur und dem Verständnis des katalytischen Mechanismus beruht; 2. die gerichtete Evolution, die auf Generierung einer genetischen Vielfalt und dem anschließenden Screening basiert und 3. dem Sequenzvergleich verwandter Proteine (Bommarius et al., 2006).

Eine der ältesten Techniken zur Beeinflussung der Thermostabilität ist die Einführung zusätzlicher Disulfidbrücken. Jedoch ist eine stabilisierende Wirkung auch hier nicht immer erfolgreich (Matsumura et al., 1989). Vielmehr ist die richtige Position der Disulfidverbrückung innerhalb der Proteinstruktur von entscheidender Bedeutung für den Stabilisierungserfolg (Creighton, 1988). Die Immobilisierung eines Enzyms kann ebenfalls die Thermostabilität erhöhen (Lee et al., 2011).

Bei kleinen, hoch homologen Proteinen, die sich jedoch in ihrer Thermostabilität unterscheiden, macht ein Aminosäuresequenz-Vergleich Sinn. Der Konsensus-Ansatz nimmt an, dass, sehr häufig an derselben Position im Sequenzalignment vorkommende Aminosäuren, eine stabilisierende Wirkung haben (Lehmann et al., 2001). Der Austausch von abweichenden Aminosäuren mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese in den mesophilen Varianten verbesserte ihre Thermostabilität deutlich (Perl et al., 2000).

Jedoch sollte der Effekt jeder einzelnen Punktmutation immer auch hinsichtlich ihres strukturellen Zusammenhangs betrachtet werden, da die biologische Funktion in großem Maße von der Konformation des gefalteten Enzyms abhängt, weniger von seiner Sequenz (Frauenfelder et al., 1988).

Scheinbar variieren die spezifischen molekularen Mechanismen, die für die Thermostabilität verantwortlich sind, von Enzym zu Enzym (Zeikus et al., 1998). So gehören zu diesen proteinstabilisierenden Mechanismen hydrophobe Wechselwirkungen, Packungsdichte, Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen (Vieille et al., 1996; Zeikus et al., 1998). Sie resultieren in einer gesteigerten konformationellen Stabilität.

Bisher herrscht jedoch noch Unklarheit darüber, welcher der Wechselwirkungen die Stabilität dominieren.

Untersuchungen zur Thermostabilität an Kälteschockproteinen führten zum Schluss, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen hauptverantwortlich für die Stabilität sind (Perl et al., 2000). Andererseits ergaben Thermostabilitätsuntersuchungen an *Staphylococcus*-Nuklease, dass weder elektrostatische Wechselwirkungen noch Wasserstoffbrückenbindungen zwingend notwendig, sondern van-der-Waals-Wechselwirkungen entscheidend sind (Chen et al., 2000).

Sowohl Mutationen nahe des aktiven Zentrums eines Enzyms, wie auch Mutationen, die davon weiter entfernt lagen haben Einfluss auf die Thermostabilität von Enzymen (Morley et al., 2005).

Es ist bekannt, dass Enzyme aus thermophilen Organismen bei höheren Temperaturen genauso aktiv sind wie ihre Gegenspieler aus mesophilen Organismen in ihren niedrigeren Temperaturen (Eijsink et al., 2004). Das lässt die Annahme zu, dass es einen Konflikt gibt zwischen hoher Stabilität und hoher Aktivität. Begründet wird das durch die benötigte Starrheit (Rigidität) der Enzyme für eine hohe Thermostabilität und der benötigten konformativen Flexibilität, die für die Aktivität eines Enzyms gebraucht wird (Radestock et al., 2011). Die Aktivität dieser hyperthermophilen Enzyme ist bei Raumtemperatur oft stark verringert, wofür eine eingeschränkte konformationelle Flexibilität verantwortlich gemacht wurde (Merz et al., 2000). Allerdings gibt es auch natürlich vorkommende, extrem thermostabile Enzyme aus Hyperthermophilen, welche auch bei niedrigen Temperaturen katalytisch hoch aktiv sind (Sternier et al., 1996). Somit schließen sich extreme Thermostabilität und gleichzeitige hohe Aktivität bei niedrigen Temperaturen nicht generell aus.

Die Adaption von Enzymen an extreme Temperaturen scheint das Ergebnis eines Kompromisses zwischen diesen beiden Faktoren Rigidität und Flexibilität zu sein.

Die Beziehung zwischen Thermostabilität und Temperaturoptimum ist ebenfalls ein Aspekt. Es gibt viele Enzyme, die ein höheres Temperaturoptimum aufweisen, aber es gibt genauso viele Beispiele in der Literatur, bei der eine höhere Thermostabilität nicht mit einer Steigerung des Temperaturoptimums einhergeht (Daniel et al., 2001; Bjork et al., 2003; Arnott et al., 2000).

Die meisten Versuche, ein Enzym thermostabiler zu gestalten, nutzten das semirationale Design.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

#### 3.1.1 Wirtsstamm JM105

Der Wirtsstamm JM105 (Amersham Pharmacia Biotech) ist ein *E. coli* K12-Stamm, der aufgrund seiner genetischen Veränderung apathogen ist und als Sicherheitsstamm bezeichnet wird. Er besitzt die Fähigkeit, Plasmide der pUC-Reihe in hoher Kopienzahl zu replizieren und fremde Gene am Lac-Promotor des Plasmids zu exprimieren. Diese Expressionsprodukte werden in der Zelle kumuliert und können durch einen Zellaufschluß gewonnen werden. Der Wirtsstamm ist streptomycinresistent und sensitiv für Kanamycin und Ampicillin. Tabelle 3.1 fasst die Eigenschaften des Wirtstammes JM105 zusammen.

JMS ist der routinemäßig eingesetzte Pall-Produktionsstamm, dessen Plasmid das *pall*-Gen trägt.

**Tabelle 3.1 Eigenschaften des *E. coli* Wirtstammes JM105**

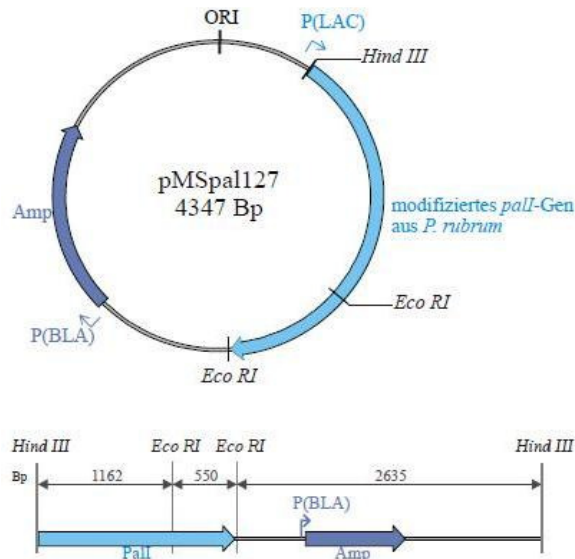
Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> JM105	thi, rpsL (Str <sup>r</sup> ), endA, sbcB15, hsdR4, supE, Δ(lac-proAB)/ F' [traD36, proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacZ ΔM15]

Quelle: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

#### 3.1.2 pMSpal127

Für die Konstruktion der Expressionsmatrizen wurde das *pall*-Gen aus *Protaminobacter rubrum* von Frau Dr. Schubert in das Plasmid pUC19 (NEB Catalog# N3041S; GenBank Accession Number: L09137) ligiert und am *lac*-Promoter in *E. coli* exprimiert. *E. coli* erkennt das heterologe Signalpeptid aus *P. rubrum* nicht und kann das rekombinante Enzym weder aus dem Cytoplasma transportieren noch das Signalpeptid abspalten. Der DNA-Bereich für das Signalpeptid wurde deshalb bei der Konstruktion der Expressionsmatrizen entfernt und durch die Anfangssequenz der  $\beta$ -Galactosidase ersetzt.

Aus diesem Plasmid sind alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pall-Mutanten entstanden, weshalb JMSpal127 auch als genetische Mutter bezeichnet wird. Die Genkarte des *pall*-Expressionsplasmids pMSpal127 ist in Abbildung 3-1 dargestellt.



**Abbildung 3-1 Genkarte des *pall*-Expressionsplasmids pMSPal127**

Sein rekombinates Pall-Enzym dient als Vergleichsbasis für alle erzeugten und untersuchten Konstrukte.

Das doppelsträngige Plasmid enthält den Replikationsursprung (ORI), den *lac*-Promoter (P(LAC)), das modifizierte *pall*-Gen aus *P. rubrum*, sowie Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen und einen Selektionsmarker (Amp), der eine Resistenz gegen Ampicillin verleiht. Bei diesem *pall*-Expressionsplasmid handelt es sich um ein „*high-copy-number-Plasmid*“, das in einer *E. coli*-Zelle 500 – 700 Kopien erreicht.

Der rekombinante *E.coli*-Stamm JMSPal127 diente bei der Charakterisierung der Pall-Eigenschaften als Referenzstamm.

## 3.2 Kultivierungsbedingungen

### 3.2.1 Verwendete Medien

Für die vorliegende Arbeit wurden standardmäßig zwei unterschiedliche Kulturmedien, LB und YeGly10, verwendet. Die genaue Zusammensetzung dieser Medien sind in Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 beschrieben.

**Tabelle 3.2 LB-Medium für die *E. coli*-Kultivierung**

Komponente	LB-Medium	
	LB-fest	LB-flüssig
Bacto-Trypton	10 g	10 g
Hefeextrakt	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar-Agar	10 g	-
Ampicillin	100 mg	100 mg
pH-Wert	7,00	7,00
ad. deion. H <sub>2</sub> O	1 L	1 L



**Tabelle 3.3 YeGly10-Medium für die Pall-Produktion**  
**YeGly10-Medium**

Komponente	Menge
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	27 mM
Hefeextrakt	15 g
NaCl	10 g
Pharmaglycerin	10 g
Ampicillin	100 mg
pH-Wert	7,00
ad. deion. H <sub>2</sub> O	1 L

Das LB-Medium wurde in fester Form für Plattenkultivierungen, in flüssiger Form zur Herstellung von Dauer- und Vorkulturen sowie für die Gewinnung der Plasmid-DNA verwendet. Das kostengünstigere Medium YeGly10 begünstigt die Pall-Expression und kam sowohl für die Pall-Produktion in der Hauptkultur als auch für das Screening neuer Transformanden in Kulturröhrchen zum Einsatz.

Die Medien wurden 20 min. bei 121 °C und 1 bar Überdruck im Autoklaven sterilisiert.

Jedem Medium wurde direkt vor der Verwendung 100 mg/L Ampicillin in Form einer sterilen Stammlösung, siehe Tabelle 3.4, zugesetzt. Für die Herstellung von LB-Platten wurde das autoklavierte Medium vor der Ampicillin-Zugabe auf unter Handtemperatur abgekühlt.

**Tabelle 3.4 Ampicillin-Stammlösung[50 mg/mL]**

Komponente	Menge
Ampicillin (Na-Salz)	5 g
ad. deion. H <sub>2</sub> O	100 mL

Die Ampicillin-Stammlösung wurde sterilfiltriert, portioniert und bei -20 °C gelagert.

### 3.2.2 Kultivierung in 5-mL-Kulturröhrchen

#### 3.2.2.1 Kultivierung in YeGly10-Medium

Für das Screening neuer Transformanden auf Pall-Aktivität wurden Einzelkolonien vom Selektionsmedium aus einer Transformation in Kulturröhrchen mit je 5 mL YeGly10-Medium und einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/mL für 19 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert (150 rpm, Auslenkung 25 mm).

#### 3.2.2.2 Kultivierung in LB-Medium

Zur Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte die Kultivierung in 5-mL-Kulturröhrchen mit LB-Medium. Dazu wurde eine Einzelkolonie in LB-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/mL für 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert (150 rpm, Auslenkung 25 mm).

### 3.2.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung der rekombinanten *E. coli*-Stämme erfolgte in 100 mL-Schüttelkolben ohne Schikanen mit einem Arbeitsvolumen von 50 mL bei 150 rpm mit einer Auslenkung von 25 mm und 37 °C. Die Kultivierungszeit betrug ca. 19 Stunden.

Die für die Kultivierung im Kulturröhrchen bzw. im Schüttelkolben verwendeten Geräte werden in Tabelle 3.5 aufgelistet.

**Tabelle 3.5      Geräteliste für die Kultivierung im Kulturröhrchen bzw. Schüttelkolben**

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage	Sartorius AnalyticA 200S	Sartorius, Göttingen, D
Autoklav	2540 ELC	Tuttnauer, Breda, NL
Autoklav	Fedegari	Tecnomara AG, Zürich, CH
Magnetrührer	IKA-Combimag Reo	IKA-Werke, Staufen, D
pH-Elektrode	InLab Micro	Mettler Toledo, Giessen, D
Inkubator	RFI-125	INFORS HAT, Bottmingen, CH
Inkubator	Ministron	INFORS HAT, Bottmingen, CH
Sterilwerkbank	HeraSafe H18	Heraeus Instruments, Hanau, D
Trockenschrank	UE 400 1400 W	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge	Rotofix 32A	Hettich, Tuttlingen, D

#### 3.2.3.1 Herstellung einer Vorkultur

Für die Vorkultur wurde eine Einzelkolonie gepickt, in 50 mL LB-Medium mit Ampicillin überführt und bei 37 °C und 150 rpm (Auslenkung 25 mm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 – 1,0 kultiviert.

#### 3.2.3.2 Herstellung der Hauptkultur

Zur Produktion des Pall-Enzyms wurde die *E. coli*-Hauptkultur in YeGly10-Medium hergestellt. Dazu wurden 1 Vol% (500 µL) einer frischen Vorkultur auf 50 mL

YeGly10-Medium mit Ampicillin gegeben und bei 37 °C und 150 rpm (Auslenkung 25 mm) inkubiert.

### 3.3 Analytik

#### 3.3.1 Bestimmung der optischen Dichte ( $OD_{600}$ )

Mit einem Photometer (T80 UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments Ltd, London, GB) wurde die Transmission der Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Referenzmedium kam deionisiertes Wasser zum Einsatz. Die optische Dichte kann unter Verwendung der Formel 3-1 aus der ermittelten Transmission errechnet werden. Die Berechnung wurde nach Einstellung aller nötigen Parameter am Photometer von der mitgelieferten Software durchgeführt.

$$OD_{600} = -\log_{10} (T_{600}/100) * f$$

**Formel 3-1**

$T_{600}$ : Transmission bei einer Wellenlänge von 600 nm  
 $f$  : Verdünnungsfaktor

#### 3.3.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

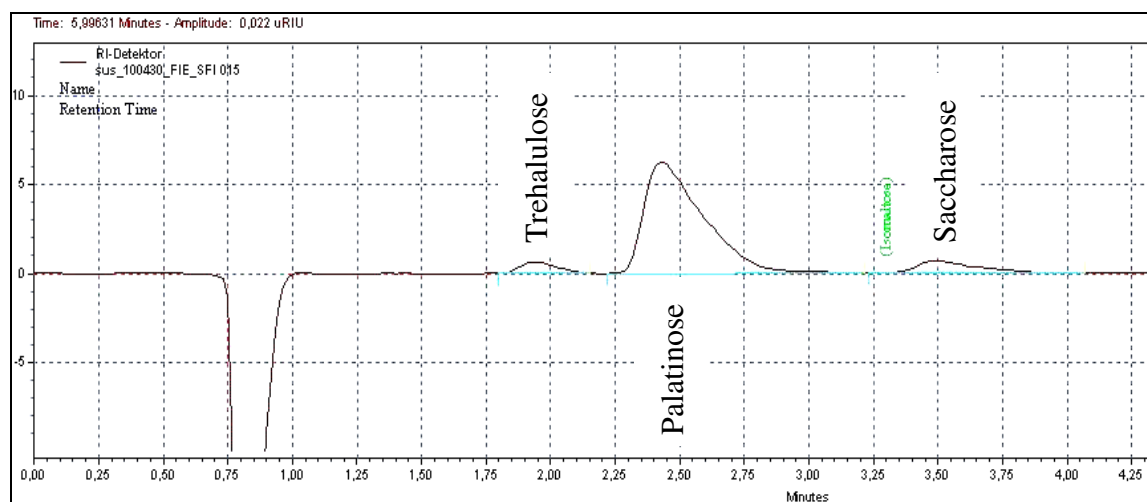
Die High performance liquid chromatography (HPLC) ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie und stellt eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse löslicher Stoffe dar. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zuckerkonzentrationen wurden an Hand von HPLC gemessen. Dazu wurden zwei unterschiedliche HPLC-Systeme verwendet (Tabelle 3.6 und Tabelle 3.8). Bestimmt wurde die Konzentration der Zucker Palatinose, Trehalulose, Glucose, Fructose, Isomaltose und Saccharose.

**Tabelle 3.6 Bestandteile HPLC-System 1**

HPLC-System 1			
Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule	HyperCarb, 100 x 3 mm	Thermo Hypersil-Keystone, Runcorn, GB	$T_{\text{Säule}}$ : 60 °C Flussrate 1 mL/min
RI-Detektor	Well Chrom K-2301	Knauer, Berlin, D	
Pumpe	Well Chrom K-501	Knauer, Berlin, D	
Degaser	Degasys Populaire	Sanwa, Tsusho, J	
Datenerfassung	Chromgate 3.17	Knauer, Berlin, D	
Autosampler	Basic Marathon	Spark Holland, Emmen, NL	Probenvolumen 10 µL
Eluent	1,5 % Acetonitril, 1 mM NaOH in Millipore-Wasser		

Mit dem HPLC-System 1 wurden die Konzentrationen der Zucker Trehalulose, Palatinose und Saccharose ermittelt. Die Substanzen wurden innerhalb von 6 min. auf der HyperCarb-Säule getrennt. Das Trennprinzip der verwendeten HyperCarb-Säule wurde von Koizumi

1991 näher beschrieben (Koizumi et al., 1991). Die Betriebsparameter sind der Tabelle 3.6 zu entnehmen. Die Retentionszeiten des HPLC-Systems 1 sind in der Abbildung 3-2 dargestellt und in der Tabelle 3.7 zusammengefasst.



**Abbildung 3-2 Retentionszeiten der Substanzen an HPLC-System 1**

**Tabelle 3.7 Retentionszeiten HPLC-System 1**

HPLC-System 1		
Substanz	Konzentration [g/L]	RI-Detektion [min]
Trehalulose	1,0	2,0
Palatinose	1,0	2,4
Isomaltose	1,0	3,3
Saccharose	1,0	3,5

Das HPLC-System 2 wurde zur Bestimmung der Konzentrationen von Palatinose, Glucose, Fructose sowie der Summe der Disaccharide genutzt. Die Messung einer Probe dauerte 15 min. Das Trennprinzip der HPX87H-Säule (BioRad, München) beruht auf einer Kombination aus Ionenaustausch-, Ionenausschluss- und Größenausschlusschromatographie. Auch für dieses System sind die Betriebsparameter in der Tabelle 3.8 angegeben.

**Tabelle 3.8 Bestandteil HPLC-System 2**

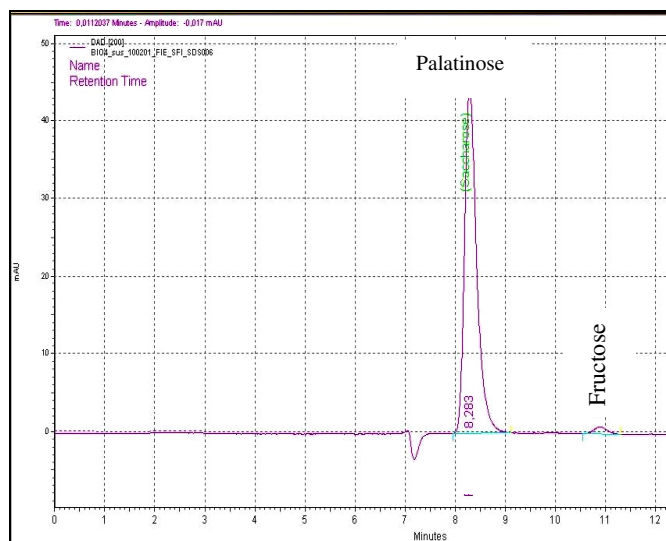
HPLC-System 2			
Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule	HPX87H, 300 mm	BioRad, München, D	T <sub>Säule</sub> : 20 °C Flussrate 0,5 mL/min
RI-Detektor	Well Chrom K-2301	Knauer, Berlin, D	
UV-Detektor	Well Chrom DAD K-2800	Knauer, Berlin, D	Wellenlänge 210 nm
Pumpe	Well Chrom K-1001	Knauer, Berlin, D	
Degaser	Well Chrom K-5004	Sanwa, Tsusho, J	
Datenerfassung	Chromgate 3.17	Knauer, Berlin, D	
Autosampler	Basic Marathon	Spark Holland, Emmen, NL	Probenvolumen 20 µL
Eluent	5 mM Schwefelsäure		

Die Retentionszeiten sind der Tabelle 3.9 und der Abbildung 3-3 zu entnehmen.

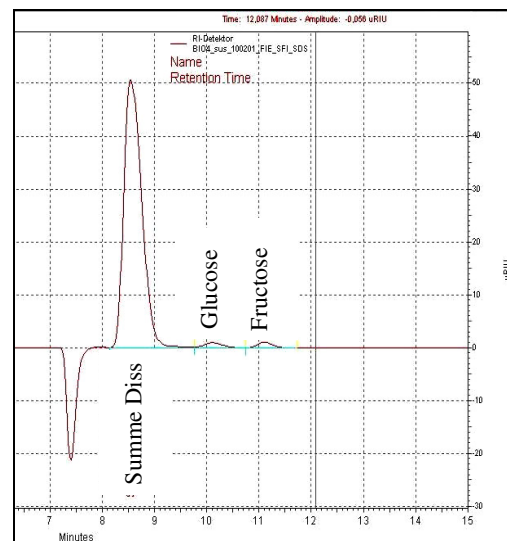
Für beide Systeme wurden die zu analysierenden Proben mit Millipore-Wasser 1:101 verdünnt.

**Tabelle 3.9 Retentionszeiten HPLC-System 2**

HPLC-System 2			
Substanz	Konzentration [g/L]	RI-Detektion [min]	UV-Detektion [min]
Dissacharide	1,0	8,5	
Palatinose	1,0		8,1
Glucose	1,0	9,8	
Fructose	1,0	10,8	



**Abbildung 3-3a Retentionszeiten am UV-Detektor**



**3-3b Retentionszeiten am RI-Detektor**

### 3.3.3 Bestimmung der Plasmid-DNA-Menge

Die präparative Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem modifizierten Standardprotokoll von Birnboim und Doly (Birnboim et al., 1979). Dazu wurden die Klone nach Abschnitt 3.2.2.2 kultiviert und die Plasmid-DNA aus 2 x 1 mL Kultur isoliert und in 40 µL TE aufgenommen.

3 µL der erhaltenen Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco RI* und *Hind III* (New England Biolabs Inc., Ipswich, GB) 3 Stunden bei 37 °C verdaut und anschließend in einem 0,7 %igen Agarosegel mit 0,2 mg/L Ethidiumbromid für 30-40 min. bei 60-70 V elektrophoretisch getrennt (Mini Elektrophorese-Kammer, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Electrophoresis Powersupply Phero-stab. 500, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen). Das Gel wurde auf einem Transilluminator bei 312 nm fotografiert. Die verwendeten Lösungen, der Restriktionsverdau und die Bestandteile des DNA-Größenstandards sind in der Tabelle 3.10, Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12 dargestellt.

**Tabelle 3.10 Verwendete Lösungen für die Quantifizierung der Plasmid-DNA**

Komponente	Bestandteile/Hersteller
10x Restriktions-Puffer	10x NEBuffer 2, New England Biolabs Inc., Ipswich, GB (500 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT; pH 7,9 bei 25 °C)
Laufpuffer 1x TAE	40 mM Trisacetat; 1mM EDTA * Na <sub>2</sub> , pH 8,3
Auftragspuffer	0,25 % w/v Bromphenolblau; 0,25 % w/v Xylencyanol FF; 40 % Saccharose
DNA-Größenstandard	1 kb DNA Ladder; New England Biolabs Inc., Ipswich, GB

**Tabelle 3.11 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA**

Komponente	Volumen [µL]
10x Restriktions-Puffer	3
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> (1 Unit Enzym/1 µg DNA/1 h)	x
Plasmid-DNA	y
steriles Millipore-Wasser	z
Gesamtvolumen	30

**Tabelle 3.12 Bestandteile des DNA-Größenstandards**

1 kB-DNA-Größenstandard		
Fragment	Größe [kBp]	Menge [ng]
1	10,0	42
2	8,0	42
3	6,0	50
4	5,0	42
5	4,0	33
6	3,0	125
7	2,0	48
8	1,5	36
9	1,0	42
10	0,5	42

### 3.3.4 Bestimmung der löslichen Proteinkonzentration

Die Mengen an Gesamtprotein und löslichen Anteilen der Zellextrakte wurden photometrisch mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Entsprechend ihrer enthaltenen Proteinkonzentration wurden die Proben mit Reaktionspuffer verdünnt. 40 µL Probe wurden mit 1200 µL Bradford-Reagenz versetzt, gut gemischt und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt bei 595 nm (T80 UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments Ltd, London, GB). Die erhaltenen Werte wurden mit einer Kalibriergeraden aus Rinderserumalbumin (engl.: *bovine serum albumin*, BSA) korreliert.

### 3.3.5 Semiquantitative Erfassung der Proteine durch SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste des Polypeptides fällt aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle nicht ins Gewicht. Im Bereich der Sättigung werden 1,4 g Natriumdodecylsulfat pro 1 g Polypeptid gebunden.

Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch einen Vergleich der Laufstrecke mit einem bekannten Protein-Marker.

In der vorliegenden Arbeit wurde die SDS-PAGE nach einem von Fr. Dr. Milada Schubert (vTI, Braunschweig) optimierten Verfahren durchgeführt.

Mit Hilfe der SDS-PAGE wurden die löslichen Fragmente der Zellextrakte analysiert. Dazu wurden 29 µL Probe mit 16 µL Loading Buffer versetzt und 5 min. bei 85 °C inkubiert. 22 µL dieses Ansatzes wurden unmittelbar auf das Gel (10 % Tris-Glycine-Gel, 1,0 mm; Novex®, Invitrogen, Karlsruhe) geladen. Der Protein-Molekulargewichtsmarker wurde 1 min. auf 80 °C erwärmt und 6 µl auf das Gel aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 125 V für ca. 100 min. (Mini-Vertikal Doppel-Elektrophorese Kammer, Standard, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Electrophoresis Powersupply Phero-stab. 500, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen).

Nach dem Lauf wurde der Laufpuffer verworfen und das Gel 3x 5 min. in deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Färbung in Coomassie-Blue-Färbelösung, die nach 15 min. durch eine Erwärmung des Gels in der Mikrowelle (20 s, 560 W) beschleunigt wurde. Um den nicht-gebundenen Farbstoff aus dem Gel zu entfernen, wurde das Gel danach 2x für 30 min. in der Fixierlösung geschwenkt. Wiederum wurde dieses nach 15 min. durch die Erhitzung in der Mikrowelle (30 s, 560 W) unterstützt. Nach 30 min. wurde die Fixierlösung ausgetauscht. Im Anschluss daran wurde das Gel in deionisiertes Wasser überführt und fotografiert. Die benötigten Lösungen und die Bestandteile des Protein-Molekulargewichtsmarkers sind der Tabelle 3.13 und Tabelle 3.14 zu entnehmen.

**Tabelle 3.13 benötigte Lösungen für SDS-PAGE**

Komponente	Bestandteile/Hersteller
SDS-PAGE-Loading-Puffer	Roti <sup>®</sup> -Load 2, k930.1, Roth, Karlsruhe
Protein-Molekulargewichtsmarker	Roti <sup>®</sup> -Mark Standard, 14,5 – 200 kDa, Roth, Karlsruhe
10x Elektrophorese-Laufpuffer	Rotiphorese <sup>®</sup> 10x SDS-PAGE, Roth, Karlsruhe (0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS; deion. H <sub>2</sub> O) Gebrauchslösung 1/10 in deion. H <sub>2</sub> O verdünnen
Coomassie-Blue-Färbelösung	0,1 % Coomassie brilliant blue R250, Roth, Karlsruhe; 40 % Ethanol; 10 % Eisessig; 50 % deion. H <sub>2</sub> O; lösen
Fixierlösung	10 % Ethanol; 7,5 % Eisessig; 82,5 % deion. H <sub>2</sub> O

**Tabelle 3.14 Bestandteile des Protein-Molekulargewichtsmarkers**

Protein-Molekulargewichtsmarker		
Protein	MW [kDa]	Konz. [mg/mL]
Myosin, Rind	200,0	0,20
β-Galactosidase, rek. <i>E. coli</i>	119,0	0,20
Serumalbumin, Rind	66,0	0,20
Ovalbumin, Huhn	43,0	0,27
Carboanhydrase	29,0	0,13
Trypsin Inhibitor, Soja	20,0	0,20
Lysozym, Huhn	14,5	0,20

### 3.4 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Sonoplus HD 200 mit Kegelspitze KE76, Bandelin electronic, Berlin) im 5-mL-Maßstab. Entsprechend der vorherrschenden Pall-Aktivität erfolgte vor dem Aufschluss die Aufkonzentrierung der Proben durch mehrmaliges Abzentrifugieren von Zellmaterial. Das Pellet wurde danach in vorgekühltem Reaktionspuffer resuspendiert und 2x mit 30 Stößen bei einer Dosis von 50 % aufgeschlossen. Um eine zu starke Erwärmung zu verhindern, wurden die Proben zwischen den Aufschlussläufen auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (8 min., 2576 g, Rotifix 32 A, Hettich Zentrifuge, Tuttlingen).

Der verwendete Reaktionspuffer ist in Tabelle 3.15 gezeigt.

**Tabelle 3.15 Bestandteile des Reaktionspuffers**

0,01 M Reaktionspuffer	
Komponente	Menge [g/L]
Calciumacetat * H <sub>2</sub> O	1,76
pH-Wert*	5,50
ad. Millipore Wasser	1 L

\* mit 10 % Essigsäure eingestellt



### 3.5 Standard-Enzymaktivität

Die für die Enzymaktivitätstests verwendeten Geräte sind in Tabelle 3.16 aufgelistet.

**Tabelle 3.16    Geräteliste für die Bestimmung der Pall-Aktivität**

Gerät	Typ	Hersteller	Bemerkung
Wasserbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D	ohne Kühlung
Wasserbad	F34-E	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D	mit Kühlung
Thermomixer	MKR13	HLC BioTech, Bovenden, D	
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D	
Vortex		Laboratory equipment, D	

Für die Ermittlung der Standard-Enzymaktivität wurden die Zellextrakte mit einer sterilen 50 %igen Saccharoselösung (siehe Tabelle 3.17) im Verhältnis 1:1 vermischt und bei 22,5 °C 1 h im Wasserbad inkubiert. Dementsprechend lag eine Substrat-Startkonzentration von 250 g/L Saccharose vor. Die Enzymreaktion wurde durch Abkochen (8 min., 100 °C Thermomixer) abgestoppt und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (5 min., 20800 g, 20 °C) abgetrennt. Entsprechend ihrer enthaltenen Zuckerkonzentration wurden die Proben mit Millipore-Wasser verdünnt und in den HPLC-Systemen 1 und 2 (siehe Abschnitt 3.3.2) vermessen. Bei Bedarf wurden Enzymlösungen vor Zugabe des Substrates mit Reaktionspuffer verdünnt.

**Tabelle 3.17    Substratlösung für die Enzymreaktion**

50 %ige Saccharoselösung	
Komponente	Menge [g/L]
Saccharose	500
ad. Reaktionspuffer*	1 L

\*siehe Tabelle 3.15

Die Lösung wurde anschließend steriltriftriert.

### 3.5.1 Berechnung der Enzymaktivität der Isomaltulose-Synthase

Die Aktivität der Isomaltulose-Synthase (Pall-Aktivität) wird als die Menge an Hauptprodukt (Palatinose in  $\mu\text{mol}$ ) definiert, die aus einem Liter *E. coli*-Kultur in einer Minute gebildet wurde.

Die Bestimmung der Pall-Aktivität wurde unter Verwendung der Formel 3-2 durchgeführt.

$$\text{Pall-Aktivität} = c_{\text{Pal}} / (MW_{\text{Pal}} * t) * 1.000.000 * f \quad \text{Formel 3-2}$$

Pall-Aktivität	:	Aktivität der Isomaltulose-Synthase [EU/L Kultur], EU/L Kultur = $\mu\text{mol/L/min}$
$c_{\text{Pal}}$	:	Konzentration der gebildeten Palatinose [g/L]
$MW_{\text{Pal}}$	:	Molekulargewicht von Palatinose [g/mol], 342,11621
$t$	:	Reaktionszeit [min]
1.000.000	:	Umrechnungsfaktor von mol auf $\mu\text{mol}$
$f$	:	Verdünnungsfaktor

### 3.6 Analyse des Produktspektrums der Isomaltulose-Synthase

Für die Aufnahme des Produktspektrums der Isomaltulose-Synthase wird der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion bis zum vollständigen Substratverbrauch analysiert. Der Begriff „vollständiger Substratverbrauch“ wird durch den Messwert von  $\leq 0,3 \%$  definiert, weil es der experimentell reproduzierbaren Messgenauigkeit für Saccharosekonzentration entspricht. Da das Enzym neben der palatinosebildenden Aktivität auch die Eigenschaft der Palatinose-Hydrolase hat, durchläuft die bei der Konversion von Saccharose gebildete Palatinose ein Maximum. Um die maximale Pall-Ausbeute ermitteln zu können, müssen Daten aus Proben über den gesamten zeitlichen Verlauf der Reaktion aufgenommen werden.

Die Pall-haltigen Zellextrakte wurden mit steriler 50 %iger Saccharoselösung (siehe Tabelle 3.17) im Verhältnis 1:1 vermischt und bei der zu untersuchenden Temperatur im Wasserbad bis zum Erreichen der maximalen Pall-Ausbeute inkubiert. Je nach Pall-Aktivität der Rekombinanten variierte die Dauer der Inkubation. Um einen zu schnellen Reaktionsverlauf zu vermeiden, wurden Proben mit sehr hoher Pall-Aktivität vor Zugabe des Substrates mit Reaktionspuffer verdünnt. Über die gesamte Reaktionszeit verteilt wurden Proben gezogen und die Enzymreaktion durch Kochen (8 min., 100 °C Thermomixer) abgestoppt. Die Proben wurden anschließend durch Zentrifugation (5 min., 20800 g, 20 °C) von unlöslichen Bestandteilen befreit, mit Millipore-Wasser verdünnt und in den HPLC-Systemen 1 und 2 (siehe Abschnitt 3.3.2) vermessen.

### 3.7 Analyse der Thermostabilität

Die Thermostabilität wurde bei einer Temperatur von 50 °C untersucht. Dazu wurden die Zellextrakte bei 50 °C im Wasserbad vorbehandelt und dann auf 22,5 °C abgekühlt. Erst nach der Substratzugabe im Verhältnis 1:1 erfolgte ein Standard-Aktivitätstest bei 22,5 °C (siehe Abschnitt 3.5). Aus dem Verbrauch an Saccharose wurde die relative Pall-Aktivität bestimmt. Als Referenz diente der Saccharoseabbau der jeweiligen Zellextrakte ohne Wärmebehandlung.

### 3.8 *In vitro* DNA-Rekombination (Klonierung) zur Herstellung der Deletionsmutanten –SFI und –FIE

Die *in vitro* DNA-Rekombination oder auch Klonierung bezeichnet eine geeignete Auswahl an molekularbiologischen Methoden, um die Integration eines Gens bzw. eines DNA-Fragments in einen Expressionsvektor und die anschließende Vermehrung und Expression in einem geeigneten Wirtssystem zu ermöglichen. Die Auswahl der Methoden und ihre Kombination sind entscheidend für den Erfolg der Klonierung. Die für die Herstellung der Deletionsmutanten verwendeten Geräte werden in Tabelle 3.18 aufgelistet.

**Tabelle 3.18** Geräteliste zur Herstellung der Deletionsmutanten

Gerät	Typ	Hersteller	Bemerkung
Wasserbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D	ohne Kühlung
Wasserbad	F34-E	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D	mit Kühlung
Thermomixer	MKR13	HLC BioTech, Bovenden, D	
Mini-Elektrophorese-Kammer		Carl Roth GmbH & Co. KG	
Thermocycler	PTC-200	MJ Research, Inc., Massachusetts, USA	
Sterilwerkbank	Peltier Thermal Herasafe H18	Heraeus Instruments, Hanau, D	
Zentrifuge	Rotofix 32A	Hettich, Tuttlingen, D	ohne Kühlung
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D	mit Kühlung
Vortex		Laboratory equipment, D	

### 3.8.1 Site-directed Mutagenese von Plasmid-DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für eine zielgerichtete Deletion wurden geeignete Primer mit der Software Vector NTI™ entworfen. Die Primer-Synthese erfolgte durch den Dienst der Fa. Inno Train, ihre Sequenz und die benötigte Arbeitskonzentration sind in Tabelle 3.19 beschrieben.

**Tabelle 3.19 Nukleotidsequenz der verwendeten Primerpaare und ihre Arbeitskonzentration**

Mutante	Primer	Sequenz	Arbeits-Konzentration
<b>-SFI</b>	forward	5'GAACAGTCGAAAACCATACC 3'	5 pmol/μL
	reverse	5'TGGCGTAATCATGGTCATAGC 3'	5 pmol/μL
<b>-FIE</b>	forward	5'CAGTCGAAAACCATACCTAAATGG 3'	5 pmol/μL
	reverse	5'GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC 3'	5 pmol/μL

#### 3.8.1.1 Phosphorylierung der Primer

Vor der Verwendung der Primer in der PCR, wurden diese einzeln mit Hilfe der T4-Kinase bei 37 °C 1 h phosphoryliert. Dieser Schritt ist nötig, um später die Enden der linearen PCR-Produkte zu ligieren. Der experimentelle Ansatz ist der Tabelle 3.20 zu entnehmen.

**Tabelle 3.20 Phosphorylierungs-Ansatz**

Komponente	Menge [μL]
Kinase-10x-Puffer	5
ATP [10mM]	1
T4-Kinase	1
unphosphorylierte Primer	50

#### 3.8.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wird mit Hilfe von hitzestabilen DNA-Polymerasen die Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* erreicht.

Die Reaktion fand im Thermocycler PTC-200 statt. In der PCR wurden die Polymerase Phusion Hot Start und der entsprechende Reaktionspuffer der Fa. Biolabs Inc., New England eingesetzt. Die benötigten Komponenten im 50 μL-PCR-Ansatz und das verwendete PCR-Programm sind in der Tabelle 3.21 und Tabelle 3.22 aufgelistet. In der PCR wurde das gewünschte DNA-Molekül amplifiziert.

**Tabelle 3.21 PCR-Ansatz zur Erzeugung von Deletionsmutanten**

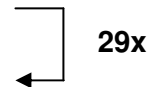
PCR-Ansätze [50 µL]			
-SFI		-FIE	
Komponenten	Menge [µL]	Komponenten	Menge [µL]
5x Puffer 518	10	5xPuffer 518	10
dNTP-Mix	4	dNTP-Mix	4
forward Primer (unphos.)	4	forward Primer (unphos.)	4
reverse Primer (phos.)	4	reverse Primer (phos.)	4
Template-DNA –I	2	Template-DNA -IE	2
Hot Start Polymerase (2 U/µL)	0,5	Hot Start Polymerase (2 U/µL)	0,5
ad deion H <sub>2</sub> O			

Zum Schutz vor Verdampfung wurden die 50 µL-Ansätze jeweils mit 30 µL Mineral-Öl überschichtet.

**Tabelle 3.22 Angewandtes PCR-Programm zur Herstellung der Deletionsmutanten**

PCR-Programm 64C10min		
Einzelschritt	Zeit	Temperatur
einleitende Denaturierung	5 min	94 °C
Denaturierung	30 s	94 °C
Annealing	1 min	64 °C
Elongation	10 min	68 °C
terminale Elongation	10 min	68 °C
Kühlen	for ever	15 °C

29x



Im Anschluss an die PCR wurde das Mineral-Öl durch Auftragen auf Parafilm von den wässrigen Substanzen getrennt. Größe, Qualität und ungefähre Konzentration des so vorgereinigten PCR-Produktes wurden nach Zugabe des Auftragungspuffers im 0,7 %igen Agarosegel kontrolliert. Dazu wurden 5 µL PCR-Produkt mit 0,5 µL Auftragungspuffer versetzt und 5 µL auf das Gel getragen.

Die Aufreinigung der restlichen Menge des PCR-Produktes erfolgte mit einem PCR-Purification-Kit nach Herstellerangaben (PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden).

### 3.8.2 Restriktionsverdau mit *DpnI*

Das Ursprungsplasmid und Hybride aus Matrizen und neu-synthetisiertem Strang wurden durch eine methylasesensitive Restriktase (hier Restriktionsenzym *DpnI*) selektiv entfernt. Weil das Ursprungsplasmid von *E. coli* synthetisiert wurde, enthält es methylierte Basen, die von *DpnI* in kleine Stücke geschnitten werden. Da die PCR-Produkte nicht-methyliert sind, werden sie während des Restriktionsverdaus nicht geschnitten. Der Verdau erfolgte für 4,5 h bei 37 °C im Thermomixer.

Tabelle 3.23 zeigt die Komponenten des Restriktionsverdaus mit *DpnI*.

**Tabelle 3.23    Ansatz des *DpnI*-Verdau**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
PCR-Produkt	35,0
Puffer	3,5
<i>DpnI</i> (20 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5

### 3.8.3 Ligation der linearen PCR-Produkte

In Vorbereitung zur Transformation der mutierten Plasmide, wurden die linearen PCR-Produkte mit Hilfe des Enzyms T4-Ligase zu zirkulären Plasmiden ligiert. Dabei wurde dem Reaktionsansatz neben den benötigten Komponenten für eine Ligation erneut das Restriktionsenzym *DpnI* zugesetzt, um mögliche Fehlligationen mit dem Ursprungsplasmid zu vermeiden. Nach Mischen der einzelnen Komponenten erfolgte die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur. Der detaillierte Ansatz ist in Tabelle 3.24 beschrieben.

**Tabelle 3.24    Ligationsansatz**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Ligase-Puffer	2,0
<i>DpnI</i> (20 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5
H <sub>2</sub> O	7,0
T4 DNA Ligase (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0,3
DNA nach <i>DpnI</i> -Verdau	10,0

Der Erfolg der Ligation wurde am nächsten Tag in einem 0,7 %igen Agarosegel kontrolliert. Dazu wurde die Hälfte des Ligationsansatzes (10  $\mu\text{L}$ ) mit 1  $\mu\text{L}$  Auftragungspuffer versetzt und 10  $\mu\text{L}$  dieses Gemisches elektrophoretisch getrennt. Als positive Kontrolle diente eine vollständig mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaute Plasmid-DNA der JMSpal 127, die ebenfalls über Nacht ligiert wurde.

### 3.8.4 Herstellung chemo-kompetenter JM105-Zellen

Zur Gewinnung chemo-kompetenter Zellen wurde der *E. coli* Stamm JM105 im 50 mL LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,8 angezogen. Die Kultur wurde 8 min. bei 4 °C und 3.000x g pelletiert. Dazu wurden 2x 25 mL der Kultur abzentrifugiert, das Pellet in 25 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 30 min. auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation wurde dieses Pellet in 3 mL 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und binnen 48 h zur Transformation verwendet. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei 4 °C.

### 3.8.5 Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation wurden 200  $\mu\text{L}$  chemo-kompetenter Zellen 40 min. mit 2 – 5  $\mu\text{L}$  DNA auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 40 s auf 42 °C im Thermomixer erhitzt.

Anschließend wurden 600 µL LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C geschüttelt. Zur Selektion wurden die Zellen auf ampicillinhaltigem LB-Agar ausplattiert.

Der Erfolg der Transformation wurde durch eine positive (2 µL pJM127) und eine negative Kontrolle (2 µL steriles H<sub>2</sub>O) kontrolliert.

### **3.8.6 Identifizierung der Mutanten**

Den ersten Schritt der Identifizierung stellt die Restriktionsanalyse dar. Dazu wurden Klone von ampicillinhaltigem LB-Agar gepickt und nach Abschnitt 3.3.3 behandelt. Da nur durch die DNA-Sequenzierung die Richtigkeit der eingeführten Mutationen verifiziert werden kann, wurden Klone mit dem erwarteten Restriktionsmuster der Plasmid-DNA ausgewählt und zur Sequenzierung an die Fa. SeqLab (Sequence Laboratorius Göttingen GmbH, Göttingen) geschickt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Aufbauend auf den Arbeiten zur Entwicklung eines leistungsfähigen Expressionssystems auf Basis von *E. coli* zur großtechnischen Herstellung des Enzyms Isomaltulose-Synthase (Pall) aus *P. rubrum* und der gentechnischen Konstruktion des Hochleistungsstammes JMSPal127 wurden mit Hilfe des semirationalen Enzymdesigns zwei unterschiedliche Mutagenese-Strategien zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der Struktur des Pall-Enzyms und der Enzym-Selektivität und -Aktivität angewandt. Aus diesen Hinweisen können Informationen gewonnen werden, welche Mutation eine Veränderung der Pall-Eigenschaft bewirkt.

Zum einen wurden aus der Expressionsmatrize des Hochleistungsstammes JMSPal127 durch gezielte Deletionen Mutanten erzeugt und die Eigenschaften der rekombinanten Pall-Enzyme wurden untersucht. Die Deletionen erfolgten bewusst an der Schnittstelle zwischen Fusionspeptid und dem Amino-Terminus (N-Terminus) des nativen Pall-Enzyms, da mit der Einführung des Fusionspeptids in JMSPal127 u.a. eine enorme Steigerung der Pall-Konzentration in den Zellextrakten beobachtet wurde (Schubert persönlich mitgeteilt).

Zum anderen wurden an definierten Positionen in dem rekombinanten Pall-Enzym Aminosäure (AS)-Substitutionen vorgenommen. Die Positionen der AS-Substitutionen wurden aus einem analytischen Vergleich der AS-Sequenzen von Pall-Enzymen unterschiedlicher Mikroorganismen ausgewählt, deren Produktspektren und damit deren Pall-Selektivität starke Unterschiede aufwiesen. Der Einfluss der jeweiligen AS-Substitution auf bestimmte Enzym-Eigenschaften, wie Aktivität, Selektivität und Thermostabilität wurde untersucht.

### 4.1 Funktionelle Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften der Pall-Enzyme aus den rekombinanten Mutanten

Im Fokus der funktionellen Charakterisierung der Mutanten stand die komparative Untersuchung der Eigenschaften ihrer rekombinanten Pall-Enzyme. Zu diesem Zweck wurden aus den Mutanten Zellextrakte hergestellt und fraktioniert. Das rekombinante Pall-Enzym befindet sich in der löslichen Fraktion der Zellextrakte, und deshalb wurden die enzymatischen Untersuchungen mit der löslichen Fraktion der Zellextrakte durchgeführt.

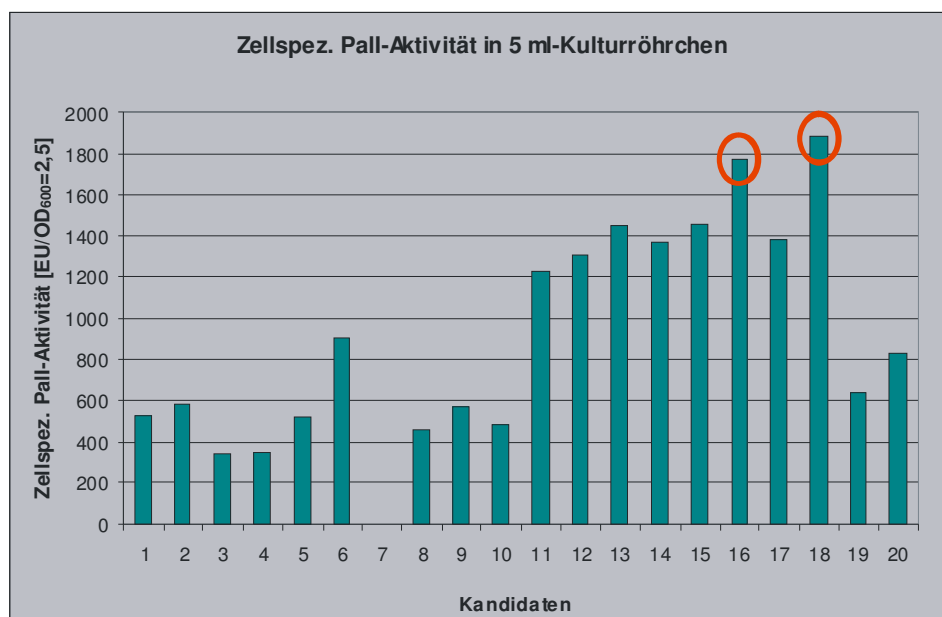
Bevor mit der Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften der rekombinanten Pall-Enzyme begonnen wurde, erfolgte die Auswahl der besten Kandidaten aus einem Pool an Transformanten und die Aufnahme des Wachstumsverhaltens im Produktionsmedium YeGly10. Es wurde der Zeitpunkt der Zellernte bestimmt und die rekombinanten Pall-Enzyme wurden durch einen Zellaufschluss in die lösliche Zellfraktion freigesetzt. Die Aufnahme des



zeitlichen Verlaufs der enzymatischen Reaktion ist notwendig, um den Zeitpunkt des vollständigen Substratverbrauches darzustellen, der mit der höchsten maximalen Palatinose-Ausbeute einhergeht und damit die Selektivität der rekombinanten Pall-Enzyme widerspiegelt.

#### 4.1.1 Screening der besten Kandidaten

Nachdem die Mutanten auf Ampicillin-haltigen LB-Platten gewonnen wurden, erfolgte das 1. Screening nach Pall-Aktivität im 5-ml-YeGly10-Maßstab. Dazu wurden einzelne Klone 19 h bei 37 °C in YeGly10 kultiviert (s. Kap. 3.2.2). Nach einem Zellaufschluss (s. Kap. 3.4) wurden die Pall-Aktivitäten in der löslichen Fraktion der Zellextrakte nach Kap. 3.5 ermittelt. Um die Pall-Aktivitäten der unterschiedlichen Klone untereinander vergleichen zu können, wurde die Pall-Aktivitätsbestimmung aus den 5-ml-Kulturröhrchen für die Zelldichte  $OD_{600} = 2,5$  standardisiert (Zellspezifische Pall-Aktivität). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-1 dargestellt. Die Pall-Aktivitäten, die in den Medienüberständen gemessen wurden, sind marginal und wurden deshalb vernachlässigt.



**Abbildung 4-1 Auswahl der besten Kandidaten anhand von zellspezifischer Pall-Aktivität im 5-ml-Maßstab**

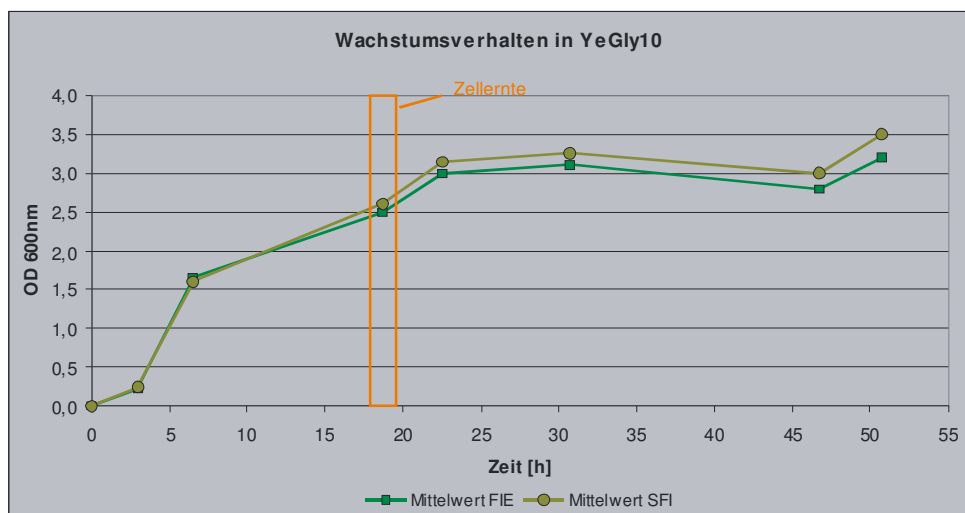
Die Pall-Aktivitäten in den Zellextrakten aus 20 Klonen (Kandidaten) der jeweiligen Mutante wurden auf die Zelldichte [ $OD_{600} = 2,5$ ] standardisiert. Die Kandidaten mit der größten Pall-Aktivität sind durch rote Kreise hervorgehoben.

Abbildung 4-1 zeigt die zellspezifischen Pall-Aktivitäten der Zellextrakte aus 20 untersuchten Klonen des rekombinanten Stammes JMSpal306 im 5-mL-Maßstab. Deutlich sind die Unterschiede in den Pall-Aktivitäten der 20 Kandidaten zu erkennen. So wurden Pall-Aktivitäten von 0 – ca. 1900 [EU/OD<sub>600</sub> = 2,5] erreicht. Kandidat 7 weist keine Pall-Aktivität in den Zellextrakten auf, während die Kandidaten 16 und 18 mit 1770 [EU/OD<sub>600</sub> = 2,5] und 1880 [EU/OD<sub>600</sub> = 2,5] die größten Pall-Aktivitäten zeigen.

Beide Kandidaten mit der größten Pall-Aktivität wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten vereinzelt und anschließend für eine Charakterisierung im 50-mL-Maßstab (s. Kap. 3.2.3) kultiviert. Auf die gleiche Weise erfolgte die Auswahl der besten Kandidaten für die übrigen rekombinanten Pall-Enzyme bei allen Substitutions- und Deletionsmutanten. Dieses 1. Screening auf Pall-Aktivität zeigt, in welcher Größenordnung die Pall-Aktivität liegt.

#### 4.1.2 Wachstumsverhalten

Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens wurden die Mutanten ausgehend von je einem Inokulum in zwei parallelen 50-mL-Kolben mit YeGly10 bei 37 °C und 150 rpm kultiviert. Die Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen beprobt und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Die genaue Vorgehensweise ist dem Kap. 3.3 zu entnehmen. Aus den beiden parallelen Ansätzen sind jeweils die Mittelwerte berechnet worden. Der Verlauf der Kultivierung ist beispielhaft mit den Deletionsmutanten JMSpalFIE und JMSpalSFI in Abbildung 4-2 und Tabelle 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4-2 Wachstumskurven der Deletionssmutanten**  
 Farbig markiert ist der Zeitpunkt der Zellernte nach ca. 19 h.

**Tabelle 4.1 Wachstumsverlauf der Deletionsmutanten im 50-mL-Maßstab**

Zeit [h]	JMSpalFIE	JMSpalSFI
	OD <sub>600nm</sub>	OD <sub>600nm</sub>
0,0	0,0	0,0
3,0	0,2	0,2
6,5	1,7	1,6
18,8	2,5	2,6
22,5	3,0	3,2
30,8	3,1	3,3
46,8	2,8	3,0
50,8	3,2	3,5

Die Deletionsmutanten zeigen ein ähnliches Wachstumsverhalten und erreichen nach ca. 50 h einen OD-Endwert von 3,2–3,5. Der beste Zeitpunkt der Zellernte liegt bei etwa 19 h: zu

diesem Zeitpunkt ist die Zelllysis minimal, da nur eine sehr geringe Pall-Aktivität in den Zellüberständen gemessen wurde, und die Pall-Expression ausreichend hoch ist (Schubert; persönliche Mitteilung).

Beide untersuchten Deletionsmutanten erreichen nach 19 h eine OD von 2,5 – 2,7.

Das Wachstumsverhalten aller in dieser Arbeit untersuchten rekombinanten Stämme wurde auf diese Weise bestimmt.

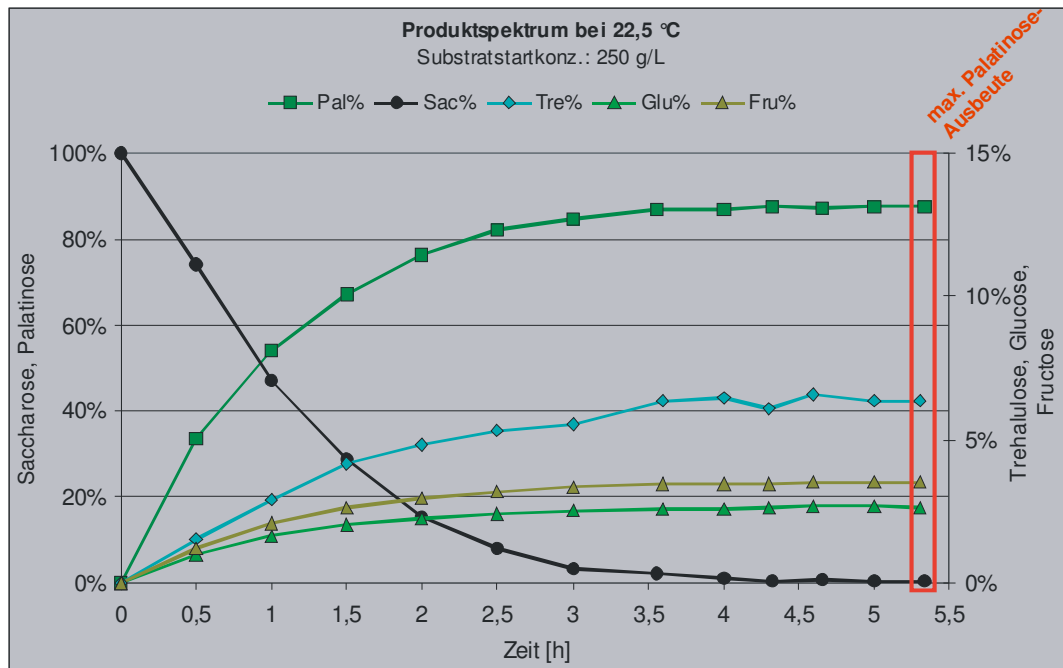
#### **4.1.3 Aufnahme des Produktspektrums**

Das Enzym Isomaltulose-Synthase aus *P. rubrum* besitzt neben der palatinosebildenden Aktivität auch die Eigenschaft einer Hydrolase, bei der Palatinose abgebaut wird und weitere Synthese-Aktivitäten. Die Hydrolyse der Palatinose erfolgt bereits während der Isomerisierung der Saccharose, sodass die gebildete Palatinose während der Konversion von Saccharose ein Maximum durchläuft (Schubert, unpubliziert). Um die maximale Palatinose-Ausbeute ermitteln zu können, müssen Daten aus Proben über den gesamten zeitlichen Ablauf der enzymatischen Reaktion aufgenommen werden. Dazu muss das Produktspektrum an möglichst vielen Zeitpunkten zwischen Substratzugabe (Reaktionsstart) und dem vollständigen Substratverbrauch vermessen und ausgewertet werden.

Die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Messwerte wurden in mindestens vier unabhängigen Versuchsreihen verifiziert.

Dazu wurde ausgehend von einem Inokulum der rekombinante Stamm in 2 parallelen Ansätzen im Produktionsmedium YeGly10 kultiviert (s. Kap. 3.2.3). Anschließend erfolgte die Gewinnung der rekombinanten Pall-Enzyme aus der zellfreien Fraktion der Zellextrakte per Zellaufschluss und Zentrifugation nach Kap. 3.4. Das Produktspektrum der rekombinanten Pall-Enzyme wurde für die Substratstartkonzentration von 25 % Saccharose analysiert. Die genaue Versuchsdurchführung zur Aufnahme des Produktspektrums ist dem Kap. 3.6 zu entnehmen. Je nach vorherrschender Pall-Aktivität variierten die Dauer der Enzymreaktion und somit auch die Zeitpunkte der Probenahme. Die zu analysierenden Proben wurden durch Zentrifugation (5 min, 20800 g, 20 °C) von unlöslichen Bestandteilen befreit, mit Millipore-Wasser 1:101 verdünnt und an den HPLC-Systemen 1 und 2 vermessen.

Abbildung 4-3 zeigt den zeitlichen Verlauf des gebildeten Produktspektrums beispielhaft an dem rekombinanten Pall-Enzym aus JMSpal513.



**Abbildung 4-3 Zeitlicher Verlauf des gebildeten Produktspektrums vom Reaktionsstart bis zum vollständigen Substratverbrauch beispielhaft an Zellextrakten aus JMSpal513**

Substratstartkonzentration: 250 g/L; Reaktionstemperatur: 22,5 °C; pH=5,5. Dargestellt ist die Saccharose-Abnahme (Sac) und die Bildung von Palatinose (Pal), Trehalulose (Tre), Glucose (Glu) und Fructose (Fru). Der Zeitpunkt der max. Palatinose-Ausbeute ist nach 5,3 h erreicht und wurde in der Grafik farbig markiert.

**Tabelle 4.2 Zeitlicher Verlauf des Produktspektrums zur Bestimmung der Enzym-Selektivität**

Zeit [h]	Pal [%]	Tre [%]	Glu [%]	Fru [%]	Sac [%]
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
0,5	33,8	1,5	1,0	1,2	74,2
1,0	53,9	2,9	1,6	2,1	47,2
1,5	67,2	4,2	2,0	2,6	28,8
2,0	76,3	4,8	2,2	3,0	15,5
2,5	82,2	5,3	2,4	3,2	7,9
3,0	84,8	5,5	2,5	3,3	3,4
3,6	86,9	6,3	2,6	3,5	2,2
4,0	86,9	6,5	2,6	3,5	1,1
4,3	87,7	6,1	2,6	3,5	0,5
4,6	87,3	6,6	2,7	3,5	0,9
5,0	87,5	6,3	2,7	3,5	0,3
5,3	87,6	6,3	2,6	3,5	0,3

Einspritzfehler der HPLC

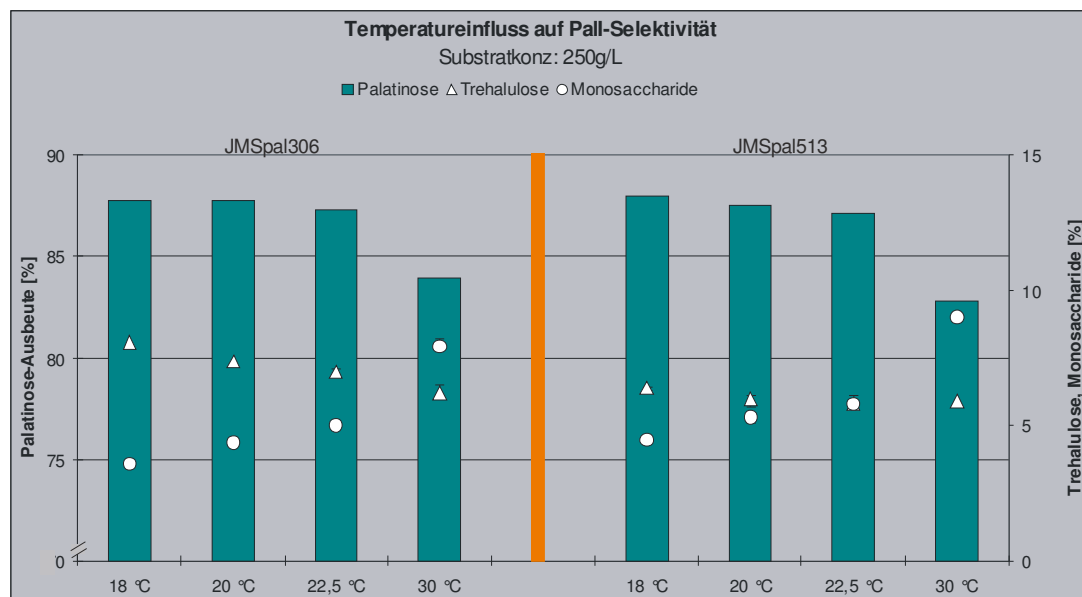
Die Summe aller detektierten Zucker bildet die Bezugsgröße 100 %, worauf die Anteile der einzelnen Zucker bezogen wurden. Bei der Auswertung der Messdaten wurde die maximale Palatinose-Ausbeute ermittelt. Nur mit Hilfe der zeitaufwändigen Vermessung des gesamten Produktspektrums ist es möglich, die Selektivität der rekombinanten Pall-Enzyme aussagekräftig zu bestimmen. In dem vorliegenden Beispiel wird die maximale Palatinose-Ausbeute nach 5,3 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden 87,6 % Palatinose, 6,3 % Trehalulose, 2,6 % Glucose und 3,5 % Fructose gebildet. Die HPLC-Messergebnisse wurden durch Kontrollmessungen im Labor der Südzucker AG verifiziert.

#### 4.1.4 Temperatureinfluss auf die Pall-Selektivität

Der Einfluss der Temperatur auf die Pall-Selektivität des rekombinanten Pall-Enzyms aus *P. rubrum* wird folgend am Beispiel der Substitutionsmutanten JMSpal306 und JMSpal513 untersucht. Der Temperatureinfluss auf die Pall-Selektivität wurde für niedrigere Reaktionstemperaturen (18 °C und 20 °C) und für höhere Reaktionstemperaturen (30 °C) als die Standard-Reaktionstemperatur von 22,5 °C untersucht.

Bei der Aufnahme der Produktspektren wurden Proben zu dicht aufeinanderfolgenden Zeitpunkten über den gesamten Ablauf der Enzymreaktionen gezogen und analysiert, wie in Kap. 4.1.3 beschrieben ist. Lediglich die Reaktionstemperatur wurde entsprechend verändert.

Abbildung 4-4 und Tabelle 4.3 zeigen die Ergebnisse.



**Abbildung 4-4 Pall-Selektivität der Substitutionsmutanten JMSpal306 und JMSpal513 bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen**

Die Produktspektren der beiden Mutanten JMSpal306 und JMSpal513 wurden bei 18 °C, 20 °C, 22,5 °C und 30 °C aufgenommen und miteinander verglichen.

**Tabelle 4.3 Pall-Selektivität bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen**

Reaktions- temperatur	JMSpal306			JMSpal513		
	Palatinose [%]	Trehalulose [%]	Monosac. [%]	Palatinose [%]	Trehalulose [%]	Monosac. [%]
18,0 °C	87,8	8,1	3,6	88,0	6,4	4,5
20,0 °C	87,8	7,5	4,3	87,5	6,0	5,3
22,5 °C	87,4	7,1	5,0	87,1	5,8	5,8
30,0 °C	84,0	6,2	7,9	82,8	5,9	9,0

Eine Senkung der Reaktionstemperatur auf 20 °C bzw. 18 °C hat eine Veränderung der Pall-Selektivität zur Folge. Während bei einer Reaktionstemperatur von 18 °C die Pall-Enzyme aus der thermostabilen Substitutionsmutante JMSpal306 signifikant mehr Trehalulose (8,1 % statt

7,1 %) und signifikant weniger Monosaccharide bilden (3,6 % statt 5,0 %), erhöht sich die maximale Palatinose-Ausbeute mit 87,8 % nur leicht. Auch für die thermolabile Substitutionsmutante JMSpal513 lässt sich der Einfluss einer niedrigeren Reaktionstemperatur auf die Pall-Selektivität feststellen. Im Vergleich zur Standard-Reaktionstemperatur von 22,5 °C wird mit 88,0 % signifikant mehr Palatinose gebildet, während sich die Trehalulose-Menge nur leicht erhöht und die Menge der Monosaccharide im gleichen Maß wie bei JMSpal306 sinkt. In der Monosaccharid-Menge sind die Anteile an Glucose und Fructose zusammengefasst. Eine Erniedrigung der Reaktionstemperatur lässt vor allem den Fructose-Anteil deutlich sinken. In JMSpal306 sinkt dieser von 2,7 % auf 1,9 % und in JMSpal513 vergleichbar von 3,2 % auf 2,4 %.

Eine Senkung der Reaktionstemperatur ist mit steigenden Prozesskosten aufgrund von Kühlung verbunden. Im Falle der Substitutionsmutante JMSpal306 ist ein industrieller Prozess bei 18 °C wirtschaftlich nicht rentabel, da sich die maximale Palatinose-Ausbeute nicht signifikant erhöht und damit die Kosten für Kühlung bzw. für das Absenken der Reaktionstemperatur nicht ausgleichen. Lediglich die Mengen der Nebenprodukte verändern sich, wobei die Trehalulose-Menge im gleichen Maß steigt, wie die Menge der Monosaccharide sinkt. Anders verhält es sich bei der thermolabilen Substitutionsmutante JMSpal513. Eine Senkung der Reaktionstemperatur auf 18 °C erhöht signifikant die maximale Palatinose-Ausbeute und lässt gleichzeitig die Menge der Monosaccharide sinken. Die Trehalulose-Menge erhöht sich dagegen nur leicht. In diesem Fall könnte sich ein Prozess bei niedrigeren Temperaturen wirtschaftlich lohnen, da die Menge an gebildeter Palatinose signifikant gesteigert werden kann.

Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur bewirkt im Allgemeinen in allen chemischen Reaktionen eine Beschleunigung der Reaktion. Wie die Erhöhung der Reaktionstemperatur von 22,5 °C auf 30 °C die Selektivität der Pall-Enzyme beeinflusst, ist ebenfalls in der Abbildung 4-4 und Tabelle 4.3 dargestellt.

Die Erhöhung der Temperatur bewirkt eine Veränderung in der Pall-Selektivität. Sowohl mit den Pall-Enzymen aus der thermostabilen Substitutionsmutante JMSpal306 als auch aus der thermolabilen Mutante JMSpal513 wird die max. Palatinose-Ausbeute reduziert. Die Pall-Enzyme aus JMSpal306 bilden bei 30 °C nur noch 84 % Palatinose und verlieren damit mehr als 3 Prozentpunkte. Noch deutlicher sinkt die maximale Palatinose-Ausbeute bei JMSpal513. Bei 30 °C werden mit 82,8 % mehr als vier Prozentpunkte weniger Palatinose gebildet. Die Pall-Menge verringert sich und die Menge an Monosacchariden, vor allem der Fructose-Anteil steigt an. Diese Veränderung trifft sowohl auf die genetische Mutter der Mutanten (JMSpal127) als auch auf die Punkt- und Deletionsmutanten zu. Des Weiteren wird eine

Beschleunigung der Reaktion beobachtet. Die vollständige Umsetzung der Saccharose als Substrat erfolgte in kürzerer Zeit.

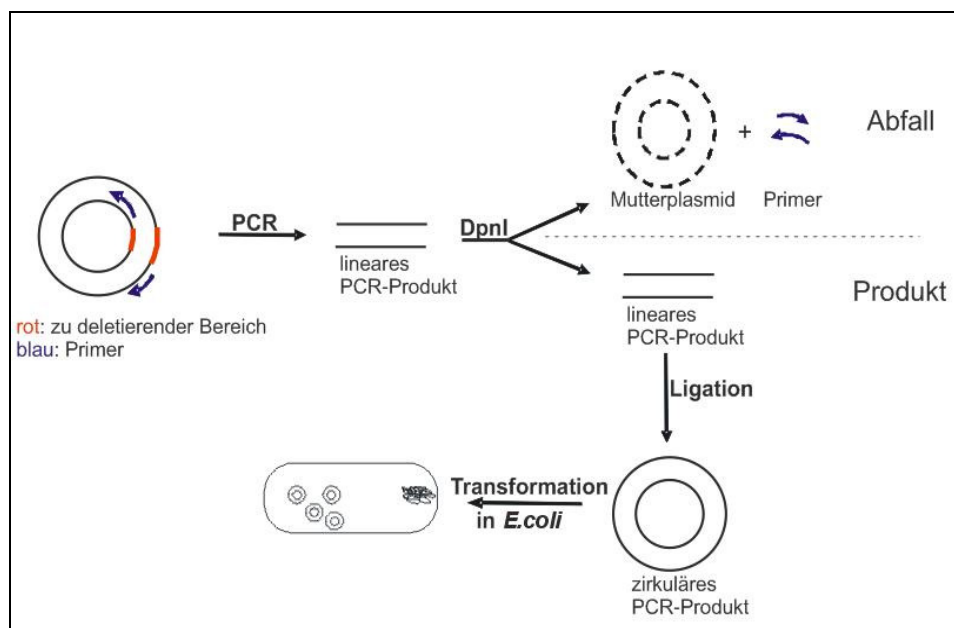
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Pall-Selektivität nicht nur vom Bakterienstamm sondern auch von Reaktionsparametern wie der Temperatur abhängt. Die Produktzusammensetzung des rekombinanten Pall-Enzyms aus *P. rubrum*-Mutanten JMSpal306 und JMSpal513 verändert sich in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur. Mit steigender Temperatur sinkt die Menge an Trehalulose, während die Monosacchride ansteigen. Dagegen wird die Bildung von Trehalulose bei niedrigen Temperaturen gefördert. Diese Wirkung der Temperatur wird auch in den Pall-Enzymen aus *P. mesoacidophila* (Watzlawick et al., 2009), *Pantoea dispersa* (Wu et al., 2005), *Klebsiella* (Zhang et al., 2002) und *Serratia plymuthica* (Veronese et al., 1999) beobachtet. Der erhöhte Fructose-Anteil bei steigenden Temperaturen wird mit einer zunehmenden Labilität der Fructose im Reaktionszentrum begründet, was die Freisetzung der Fructose begünstigt und einen Anstieg der Monosaccharide verursacht (Lipski et al., 2010).

## 4.2 Deletionsmutanten

### 4.2.1 Auswahl der Klonierungsstrategie

Weitgehend entscheidend für eine erfolgreiche Klonierung ist die Wahl der richtigen Strategie, das heißt, die Auswahl der für den speziellen Fall geeigneten Methoden, wie Phosphorylierung, Ligation, Transformation, Elution der Fragmente aus Agarosegelen oder anderen Methoden zur Aufreinigung von DNA und ihre Kombination miteinander. Um den experimentellen Fehler so gering wie möglich zu halten, wurden so wenige Einzelschritte wie möglich ausgearbeitet. Als Wirt für die Fremdgenexpression wurde ein *E. coli*-Stamm verwendet, dessen Plasmid-DNA methyliert ist. Diese Eigenschaft wurde als Selektionsmerkmal zur Trennung von methylierter Matrizen-DNA und den neu synthetisierten PCR-Produkten genutzt.

Die Strategie zur Herstellung der Deletionsmutanten sieht folgendermaßen aus:



**Abbildung 4-5 Klonierungsstrategie zur Herstellung der Deletionsmutanten**

Die Strategie besteht aus der PCR zur Einführung der Deletionen, dem DpnI-Verdau zur Trennung methylierter Matrizen-DNA (Mutterplasmid) von nicht-methylierten PCR-Produkten, der Ligation der linearen PCR-Produkte zu zirkulären Produkten und der Transformation der zirkulären Plasmide in *E. coli*-Zellen.

Bei der Einführung einer Deletion werden die Primerbindungsstellen so bestimmt, dass der zu amplifizierende Bereich durch die Primer flankiert wird. Unter Verwendung phosphorylierter Primer werden in der PCR lineare DNA-Moleküle synthetisiert, die die gewünschten Deletionen enthalten. Im vorliegenden DNA-Gemisch befinden sich neben den PCR-Produkten auch noch die eingesetzten Templates und Komponenten der PCR-Reaktion. Die methylasesensitive Restriktase *DpnI* spaltet spezifisch methylierte DNA, die nicht methylierten PCR-Produkte bleiben dagegen erhalten. Im Anschluss daran werden die



linearen PCR-Produkte zu zirkulärer DNA ligiert. Die so entstandenen zirkulären Plasmide werden in chemo-kompetente und ampicillinsensitive *E. coli*-Zellen transformiert. In Abschnitt 3.8 ff. ist die detaillierte Vorgehensweise beschrieben.

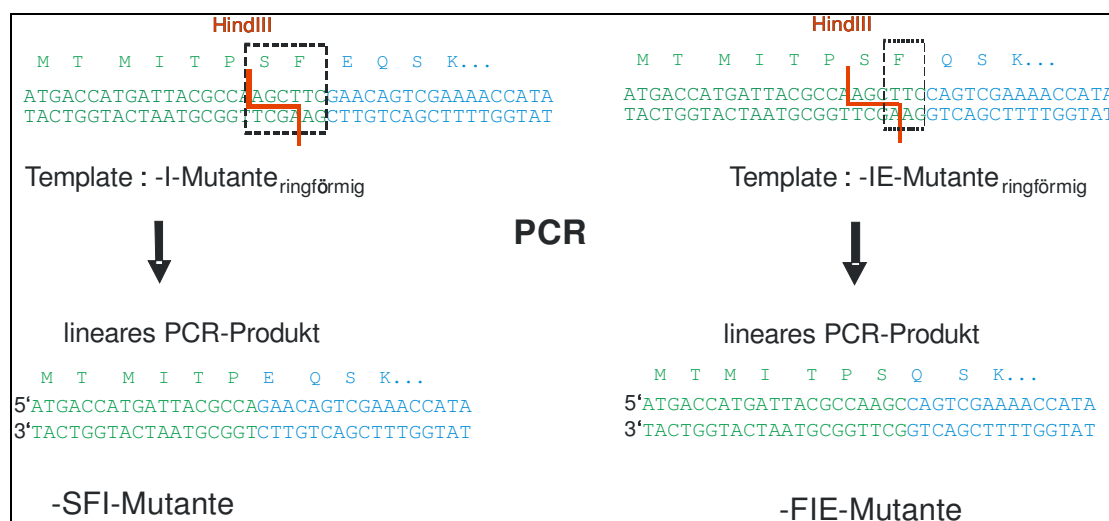
#### 4.2.2 Selektion der Deletionsmutanten

Neben der Strategie zur Herstellung dieser Mutanten ist die Wahl der Selektions- und Screeningmethode ein entscheidendes Kriterium für eine erfolgreiche Mutagenese.

Die erste Selektion der rekombinanten Mutanten entsteht durch die gewonnene Ampicillinresistenz bei erfolgreichen Transformanden. So sind alle *E. coli*-Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, auf ampicillinhaltigem Agar lebensfähig, wohingegen Zellen ohne Plasmid wachstumsunfähig sind.

Die Selektion der gewünschten Deletionsmutanten erfolgt aus der Analyse der Restriktionsmuster, die aus dem Verdau der rekombinanten Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* entstehen. In der ursprünglichen Plasmid-DNA befindet sich eine *HindIII*-Schnittstelle, die durch die Deletion der ausgewählten Nukleotide zerstört wird und wodurch die Deletionsmutanten ein verändertes Restriktionsmuster der Plasmid-DNA aufweisen.

Abbildung 4-6 zeigt den Verlust der *HindIII*-Schnittstelle nach Einführung der Deletion auf Ebene der Nukleotidsequenz.



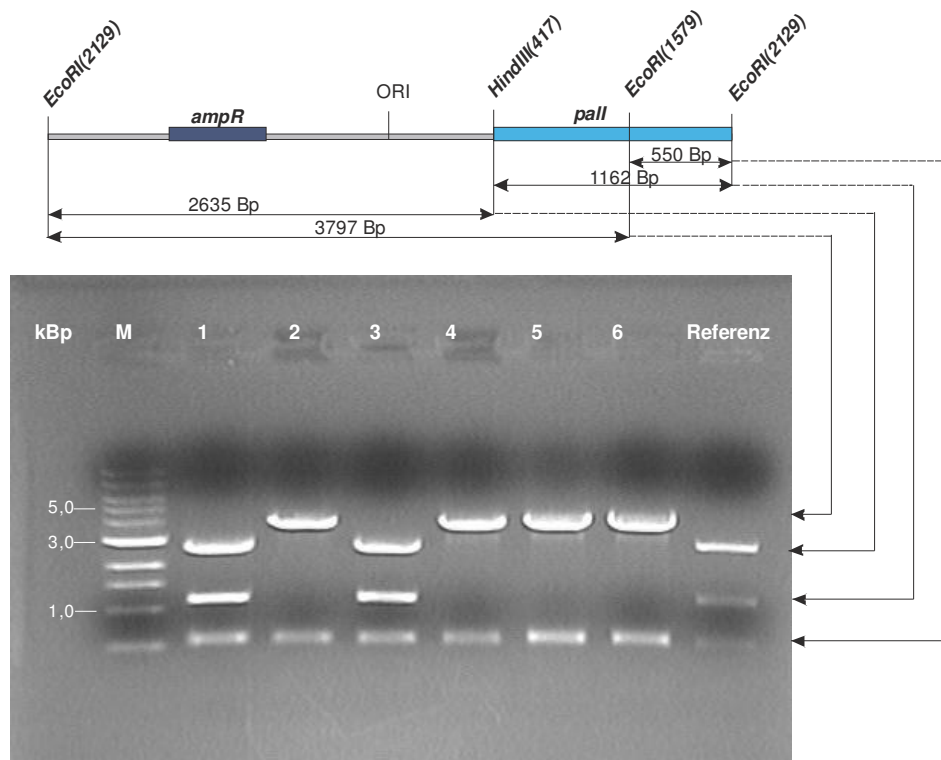
**Abbildung 4-6 Ausschnitt der Nukleotidsequenz von Template und linearem PCR-Produkt der jeweiligen Deletionsmutante JMSpalSFI und JMSpalFIE**

Die *HindIII*-Schnittstelle ist durch eine rote Linie und der zu deletierende DNA-Bereich durch ein schwarz-gestricheltes Kästchen markiert. Durch die Einführung der Deletionen geht eine *HindIII*-Schnittstelle verloren, wodurch das Restriktionsmuster verändert wird.

Für die Generierung der Deletionsmutanten JMSpalFIE und JMSpalSFI werden sowohl zwei unterschiedliche Primerpaare, als auch zwei unterschiedliche Templates in der PCR-Reaktion eingesetzt. In beiden Templates ist die *HindIII*-Schnittstelle vorhanden. Mit Deletion

der einzelnen Nukleotide, wird die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *HindIII* zerstört und die Schnittstelle geht verloren.

Um die rekombinanten Mutanten zu selektieren, wurde die jeweilige Plasmid-DNA isoliert, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut und anschließend in einem 0,7 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die genaue Versuchsdurchführung ist dem Kap. 3.3.3 zu entnehmen. Abbildung 4-7 zeigt die Ergebnisse.



**Abbildung 4-7 Restriktionskarte des linearisierten Plasmids pMSpal127 und Foto des Agarosegels mit Restriktionsfragmenten nach einem vollständigen Doppelverdau mit *EcoRI* und *HindIII***

M: 1 kB-Längenstandard, 1-6: Bandenmuster der Plasmid-DNA aus den Deletions-Kandidaten. Als Referenz dient das Bandenmuster der ursprünglichen Matrize (pJMSpal127). Hier ist die *HindIII*-Schnittstelle vorhanden und es ergeben sich 3 Banden der Größe 2,6 kBp, 1,2 kBp und 0,5 kBp. Kandidaten, bei denen die *HindIII*-Schnittstelle durch die Deletion zerstört wurde (Spuren Nr. 2, 4, 5 und 6), zeigen nur noch 2 Banden im Agarosegel: 3,8 kBp und 0,5 kBp.

Vier der sechs untersuchten Kandidaten zeigen das entsprechende Bandenmuster der Deletionsmutanten. Aufgrund der eingeführten Deletionen wurde die *HindIII*-Schnittstelle zerstört, sodass die Restriktion der Plasmid-DNA mit *EcoRI/HindIII* nur zwei Fragmente der Größen 3797 Bp und 550 Bp ergibt.

Der Erfolg der Deletion der Nukleotide bzw. Aminosäuren wurde anschließend durch die Sequenzierung der Plasmid-DNA verifiziert. Abbildung 4-8 stellt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Deletionsmutanten im Anfangsbereich dar.

N-Terminus	M	T	M	I	T	P	S	F	I	E	Q	S...	...C-Terminus	JMSpal127
	5'...	atg	acc	atg	att	acg	cca	agc	ttc	atc	gaa	cag	tcg...	3'
-----														
N-Terminus	M	T	M	I	T	P	S	Q	S...				...C-Terminus	JMSpalFIE
	5'...	atg	acc	atg	att	acg	cca	agc	cag	tcg...				3'
N-Terminus	M	T	M	I	T	P	E	Q	S...				...C-Terminus	JMSpalSFI
	5'...	atg	acc	atg	att	acg	cca	gaa	cag	tcg...				3'

**Abbildung 4-8 Die partielle Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Deletionsmutanten im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz der Referenz JMSpal127**

Im Ein-Buchstaben-Code ist die Aminosäuresequenz dargestellt, darunter die Nukleotidsequenz. Die Deletionen erfolgten an der Schnittstelle zwischen Fusionspeptid (in grüner Schrift) und dem Amino-Terminus des nativen Pall-Enzyms (in blauer Schrift).

Die Deletionsmutante JMSpalFIE zeigt ein um eine Aminosäure verkürztes Fusionspeptid und ein zwei Aminosäuren kürzeres natives Pall-Enzym. Die Aminosäuren Phe (F), Ile (I) und Glu (E) wurden deletiert. Die Deletionsmutante JMSpalSFI weist hingegen nur noch sechs Aminosäuren im Fusionspeptid auf, Ser (S) und Phe (F) wurden deletiert. Verglichen mit der JMSpal127 wurde auf Seiten des nativen Pall-Enzyms nur die erste Aminosäure, Ile (I) entfernt. In der restlichen Nukleotidsequenz des *pall*-Gens sind beide Deletionsmutanten mit der JMSpal127 identisch.

#### 4.2.3 Auswirkung der Deletionen auf die Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms

Um den Einfluß der Deletionen auf die Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms aus *P. rubrum* zu erforschen, wurden die physiologischen Eigenschaften der Deletionsmutanten mit denen des Referenz-Stammes JMSpal127 verglichen. Ausgehend von einem Inokulum wurden die Stämme in zwei parallelen 50-mL-YeGly10-Schüttelkolben bei 37 °C und 150 rpm für ca. 19 h kultiviert. Die rekombinanten Pall-Enzyme wurden über einen Zellaufschluss in die lösliche Zellfraktion freigesetzt (s. Abschnitt 3.4).

Charakterisiert wurden folgende Eigenschaften der Pall-Enzyme in der löslichen Zellfraktion:

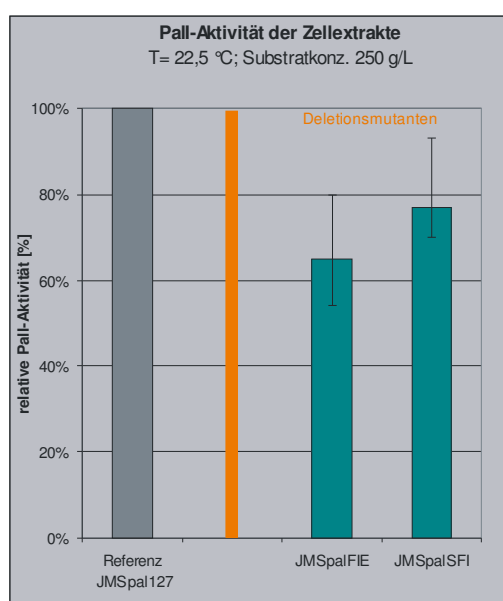
- Pall-Aktivität der Zellextrakte
- Pall-Expression
- Pall-Selektivität
- Pall-Thermostabilität bei 50 °C

Neben den beiden Deletionsmutanten wurde der Referenzstamm JMSpal127 vergleichend mitgeführt.

#### 4.2.3.1 Pall-Aktivität der Zellextrakte

In Abbildung 4-9 und Tabelle 4.4 ist die Pall-Aktivität der Zellextrakte aus den beiden Deletionsmutanten und JMSpal127 als Referenz dargestellt. Alle in dieser Versuchsreihe verglichenen Pall-Enzyme stammen aus Zellextrakten, die aus 50-mL-Kulturen semiquantitativ identisch mit einer End-OD<sub>600</sub> von  $2,4 \pm 0,3$  hergestellt wurden.

Aufgetragen wurden die Mittelwerte der Aktivitäten aus 7 unabhängigen Kultivierungen und Zellaufschlüssen. Die gemessene Pall-Aktivität der Referenz bildet die Bezugsgröße 100 %, worauf die Pall-Aktivitäten aus den Zellextrakten der beiden Deletionsmutanten bezogen wurden.



**Abbildung 4-9 Relative Pall-Aktivitäten der Deletionsmutanten in Bezug auf die Referenz JMSpal127**

**Tabelle 4.4 Pall-Aktivität der Deletionsmutanten**

Stamm	Mittelwerte der relativen Pall-Aktivität der Zellextrakte [%]	Mutation(en)
JMSpal127	100	Ins(MTMITPSF <sub>8</sub> )
JMSpalFIE	65 ± 20	Ins(MTMITPS <sub>7</sub> ), Del(IE)
JMSpalSFI	77 ± 16	Ins(MTMITP <sub>6</sub> ), Del(I)

Die Zellextrakte aus den beiden Deletionsmutanten erreichen nicht die Pall-Aktivitätswerte der Referenz JMSpal127. Bezogen auf die Aktivität der Referenz-Zellextrakte erreichen die Zellextrakte aus JMSpalFIE ca. 65 % der Aktivität. Die Zellextrakte aus JMSpalSFI erzielen ca. 77 % der Referenzwerte. Die Fehlerbalken zeigen die experimentell bedingten Schwankungen.

Es zeigt sich, dass Deletionen im Bereich der Fusionsstelle am Anfang des rekombinanten Pall-Enzyms einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Zellextrakte haben. Ein Verlust

von zwei AS (Ile und Glu) im nativen Pall-Enzym wirkt sich deutlich stärker auf die Pall-Aktivität der Zellextrakte aus, als der Verlust von Ile allein.

Mit der Ermittlung der Pall-Aktivität wird nur das aktive Pall-Enzym erfasst, eine Auskunft über die tatsächliche Menge des Pall-Enzyms in den Zellextrakten oder über die Expression von nicht-aktiven Pall-Molekülen wird mit dieser Methode nicht gegeben.

Vor diesem Hintergrund kann die Verringerung der Pall-Aktivität diverse Gründe haben:

1. die spezifische Aktivität des Pall-Enzyms ist vermindert. Als spezifische Aktivität bezeichnet man die Aktivität bezogen auf eine definierte Menge Enzym. Eine verminderte spezifische Pall-Aktivität würde bedeuten, das Pall-Enzym arbeitet im Vergleich zum Referenz-Enzym schlechter.

2. die exprimierte Pall-Menge ist reduziert. Die Ursache dafür könnte in einer verschlechterten Expression des Pall-Enzyms liegen, wodurch weniger Pall-Moleküle gebildet werden.

Die Bildung instabiler Pall-Moleküle könnte ebenfalls ein Grund für eine geringere Menge an Pall-Molekülen darstellen.

3. die Anzahl der Plasmide und damit die Anzahl der Expressionsmatrizen sind in reduzierter Menge vorhanden (Plasmidverlust). Steht weniger Matrize zur Verfügung, wird entsprechend weniger Pall-Enzym exprimiert.

Um diese Aspekte näher zu betrachten, wurden vergleichende Analysen der Pall-Expression durchgeführt.

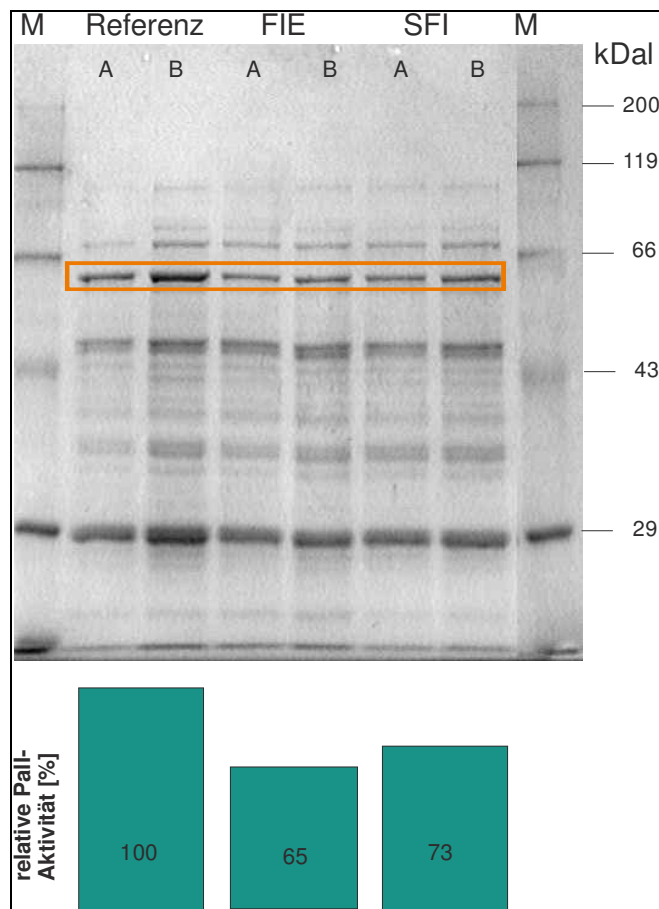
#### 4.2.3.2 Pall-Expression

Sowohl für die Ermittlung der spezifischen Aktivität als auch der Beurteilung der exprimierten Pall-Menge ist die Quantifizierung der gebildeten Pall-Moleküle auf Ebene der Expression nötig. Für die Visualisierung der Pall-Expression wurde die SDS-PAGE-Analytik gewählt. Mit dieser Methode kann das Pall-Enzym sichtbar gemacht werden, so dass eine semiquantitative Schätzung der gebildeten Pall-Moleküle möglich ist. Zusammen mit der Bestimmung von Proteinkonzentration und Enzymaktivität lässt sich so ein umfassendes Bild zur heterologen Pall-Expression erstellen.

Ausgangspunkt der Pall-Expression ist die Expressionsmatrize. Das verwendete Expressionssystem arbeitet mit einem high-copy-number-Plasmid nach dem Prinzip der erhöhten Gendosis. Die Expression des Pall-Enzyms findet in *E. coli* am Lac-Promoter des Plasmids statt (s. Abschnitt 3.1). Die Anzahl der Expressionsmatrizen wird durch die Plasmid-Menge bestimmt. Mit einer semiquantitativen Ermittlung der Plasmid-Menge kann die zur Verfügung stehende Anzahl der Expressionsmatrizen analysiert werden.

#### 4.2.3.3 Semiquantitative Erfassung der Pall-Menge durch SDS-PAGE-Analytik

Für die Erfassung der Pall-Menge wurden die Proteine in den löslichen Fraktionen der Zellextrakte aus den Deletionsmutanten mittels SDS-PAGE der Größe nach getrennt und visualisiert (s. Kap. 3.3.5) und mit denen der Referenz (JMSPal127) verglichen. Die Menge des exprimierten Pall-Enzyms wurde aus dem Foto des Gels der SDS-PAGE mit dem Programm *TotalLab* semiquantitativ ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-10 und Tabelle 4.5 gezeigt.



**Abbildung 4-10 Vergleichende Analyse der Pall-Expression und dazugehörige, schematisch dargestellte relative Pall-Aktivitäten**

M: Marker; Referenz: lösliche Fraktion aus JMSPal127; FIE: lösliche Fraktion aus JMSPalFIE; SFI: lösliche Fraktion aus JMSPalSFI; A und B: Doppelansatz. Die Zellen wurden vor dem Aufschluss 2fach aufkonzentriert. Die Proben wurden nach Kap. 3.3.5 aufbereitet und auf einem 10 %igen SDS-Gel bei 123 V elektrophoretisch aufgetrennt. Pro Tasche wurde ~ 14 µl Probe aufgetragen, die Markerbande von 66 kDal entspricht einer Masse von 1 µg Protein. Die diskrete Pall-Bande ist farbig umrahmt.

Abbildung 4-10 stellt die Bandenprofile der Zellextrakte der Referenz und der Deletionsmutanten sowie eines Proteingrößenstandard (Marker) dar. Das Pall-Enzym ist als diskrete Bande im Bereich von knapp 66 kDal sichtbar und wurde durch einen farbigen Rahmen hervorgehoben. Die dazu gemessenen Pall-Aktivitäten wurden verhältnismäßig in grünen Balken dargestellt. Aus der Bandenintensität wurde die Proteinmenge semiquantitativ

geschätzt. Bezugsgröße mit 100 % sind die Werte, die mit dem Referenz-Stamm (JMSpal127) erhalten wurden. Die Proteinmenge, der Pall-Anteil am löslichen Protein und die Pall-Aktivität der beiden Deletionsmutanten wurden auf die Referenzwerte bezogen und in Tabelle 4.5 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 4.5 Semiquantitative Auswertung der SDS-PAGE der Zellextrakte aus den Deletionsmutanten bezogen auf den Referenz-Stamm JMSpal127**

	Referenz	JMSpalFIE	JMSpalSFI
<b>relative Menge an löslichen Protein [%]</b>	100	100	100
<b>Pall-Menge [%]</b>	100	<b>75</b>	92
<b>Pall-Anteil am löslichen Protein [%]</b>	100	80	100
<b>relative Pall-Aktivität [%]</b>	100	<b>65</b>	<b>73</b>

Eine vergleichende Analyse der Intensität der Pall-Bande zeigt, dass das Pall-Enzym aus JMSpalSFI in etwa der gleichen Menge vorliegt wie das Pall-Enzym aus der Referenz (92 %). Der Anteil dieser Proteinmenge am löslichen Protein ist identisch mit dem Referenzwert. Die Pall-Aktivität in den Zellextrakten dieser Mutante ist schwächer als die Pall-Aktivität der Referenz. Es werden 73 % des Referenzwertes erzielt. Die spezifische Pall-Aktivität erreicht im Vergleich zu der Referenz 80 %.

Die Ursache für die geringere Pall-Aktivität in den Zellextrakten der Deletionsmutante JMSpalSFI liegt in der verminderten spezifischen Aktivität des Pall-Enzyms. Die Expression des Pall-Enzyms wird durch die Deletion der drei AS Ser, Phe und Ile nicht beeinträchtigt.

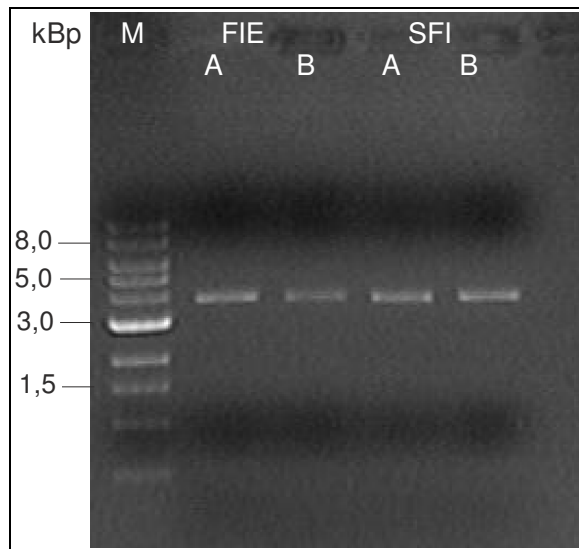
Die Deletionsmutante JMSpalFIE erreicht 75 % der Pall-Menge der Referenz. Das bedeutet, dass in der Deletionsmutante JMSpalFIE eine geringere Menge an Pall-Enzym exprimiert wird. Die Pall-Aktivität erzielt 65 % der Referenz-Aktivität.

Die verminderte Enzym-Aktivität dieser Mutanten scheint durch die verringerte exprimierte Enzymmenge begründet. Die spezifische Aktivität liegt mit 86 % leicht unter dem Referenzwert. Ob die verminderte exprimierte Pall-Menge auf eine reduzierte Anzahl der Expressionsmatrizen zurückzuführen ist, wird im anschließenden Kapitel geklärt.

#### 4.2.3.4 Ermittlung der relativen Kopienzahl der Plasmide

Um festzustellen, wie viele Kopien der Expressionsmatrize die Deletionsmutanten in der Zelle enthalten, erfolgte eine semiquantitative Analyse der vorhandenen Plasmid-DNA. Die Kultivierung aller in dieser Versuchsreihe verglichenen Stämme erfolgte unter identischen Bedingungen in 5-mL-Kulturröhrchen mit einer End-OD<sub>600</sub> von  $1,4 \pm 0,2$ .

Die Plasmid-DNA wurde isoliert, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut und anschließend in einem 0,7 %igen Agarosegel der Größe nach elektrophoretisch getrennt (s. Kap. 3.3.3).



**Abbildung 4-11 Plasmid-DNA aus Deletionsmutanten nach einer Restriktion mit *EcoRI* und *HindIII* und elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel**

M: 1 kb Längenstandard, 0,5 µg; FIE: Plasmid-DNA aus JMSpalFIE; SFI: Plasmid-DNA aus JMSpalSFI; A und B stehen für einen Doppelansatz, jeweils 1,5 µl Plasmid-DNA aus einer Standard-Präparation (s. Kap. 3.3.3) wurden aufgetragen.

In Abbildung 4-11 sind bei allen 4 Proben zwei Restriktionsfragmente als Banden erkennbar; eine intensivere Bande der Größe 3,8 kBp und eine etwas schwächere im Bereich von 0,5 kBp. Aus der Intensität der 3,8-kBp-Bande kann die vorhandene Plasmidmenge semiquantitativ abgeschätzt werden. Sowohl die Doppelansätze (A und B) als auch die beiden unterschiedlichen Deletionsmutanten JMSpalFIE und JMSpalSFI zeigen nahezu gleiche Plasmidmengen. Es steht demnach in beiden Mutanten eine etwa gleiche Kopienzahl der Expressionsmatrize zur Verfügung.

Das bedeutet, dass die geringere Pall-Menge in JMSpalFIE nicht mit einer niedrigeren Anzahl der Expressionsmatrizen begründet werden kann, da beide Deletionsmutanten eine etwa gleiche Plasmidmenge aufweisen.

Die Gründe für die niedrigere Pall-Aktivität der Zellextrakte aus JMSpalFIE sind offensichtlich auf der Ebene der Expression des Pall-Enzyms zu suchen. Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analytik deuten auf eine verschlechterte Pall-Expression und/oder die Bildung instabiler Pall-Moleküle hin.

Anders verhält es sich bei der Deletionsmutante JMSpalSFI. Die gentechnische Manipulation zeigt hier keinen signifikanten Einfluß auf die exprimierte Menge des Pall-Enzyms, bewirkt jedoch eine Reduktion seiner spezifischen Aktivität.

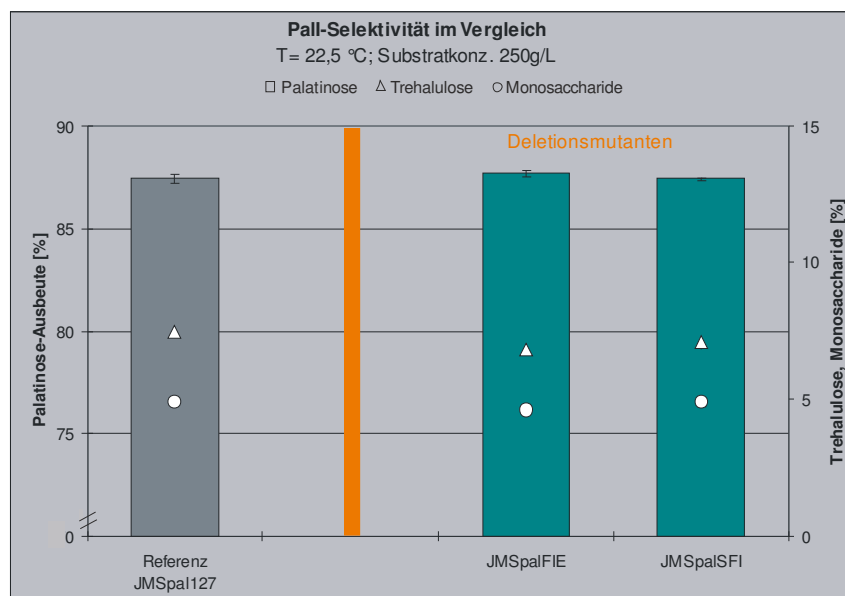
Die vergleichende Analyse der Pall-Expression der beiden unterschiedlichen Deletionsmutanten JMSpalSFI und JMSpalFIE manifestiert, dass die Deletion der drei AS Phe, Ile und Glu am Anfang des Pall-Enzyms einen signifikanten Einfluss auf die exprimierte



Pall-Menge ausübt, wogegen die Deletion von Ser, Phe und Ile die spezifische Aktivität des Pall-Enzyms beeinträchtigt.

#### 4.2.3.5 Pall-Selektivität der Deletionsmutanten

Die Untersuchung der Pall-Selektivität erfolgte über die Aufnahme der Produktspektren während des gesamten Verlaufs der Enzymreaktion; vom Reaktionsstart durch Substratzugabe bis zum vollständigen Substratverbrauch. Neben den Pall-Enzymen aus den beiden Deletionsmutanten wurde die Selektivität des Referenz-Enzyms aus JMSPal127 vergleichend hinzugezogen. Die Aufnahme der Produktspektren erfolgte, wie in Kap. 3.6 und Kap. 4.1.3 erläutert, und wurde aus mindestens vier unabhängigen Messungen gemittelt.



**Abbildung 4-12** Pall-Selektivität der Deletionsmutanten im Vergleich

**Tabelle 4.6** Pall-Selektivität der Deletionsmutanten im Vergleich

Stamm	Palatinose* [%]	Trehalulose* [%]	Monosaccharide* [%]	Rest* [%]
Referenz	87,4 ± 0,2	7,5	4,9	0,1
JMSPalFIE	87,7 ± 0,2	<b>6,8 ± 0,1</b>	4,6	<b>0,9</b>
JMSPalSFI	87,4 ± 0,1	7,1 ± 0,3	4,9	0,6

\*Mittelwerte aus 4 unabhängigen Messungen

Palatinose stellt mit ca. 87 % das Hauptprodukt der enzymatischen Saccharose-Konversion dar. Trehalulose mit ca 7 % und die beiden Monosaccharide Glucose und Fructose (zusammen ca. 5 %) bilden die wesentlichen Nebenprodukte.

Aus Abbildung 4-12 und Tabelle 4.6 wird deutlich, dass das Produktspektrum der Deletionsmutante JMSPalSFI dem der Referenz JMSPal127 entspricht. Mit dem Wert 87,4 % wird die gleiche maximale Palatinose-Ausbeute erreicht und auch die Menge der Nebenprodukte, Trehalulose und Monosaccharide, bleiben unverändert.

Die Deletionsmutante JMSpalFIE zeigt eine leichte Verschiebung im Produktspektrum. Die Trehalulose-Menge wurde mit 6,8 % leicht gesenkt, während sich die Menge der restlichen Zucker leicht erhöht hat. Die maximale Palatinose-Ausbeute wird nicht signifikant beeinflusst und erreicht mit 87,7 % in etwa den Referenzwert.

Die Bildung der Monosaccharide wird durch die Deletionen am Anfang des rekombinanten Pall-Enzyms nicht signifikant beeinflusst. Deletionen der AS Phe, Ile und Glu im Vergleich zur Deletion von Ser, Phe und Ile bewirken eine leichte Reduzierung der Trehalulose-Menge. Gleichzeitig wurde die Menge der restlichen Zucker leicht erhöht.

Die maximale Palatinose-Ausbeute von 87,4 % bleibt auch nach dem Verlust der ersten beiden Aminosäuren des nativen Enzyms und einer Verkürzung des Fusionspeptids um die letzten beiden Aminosäuren unverändert.

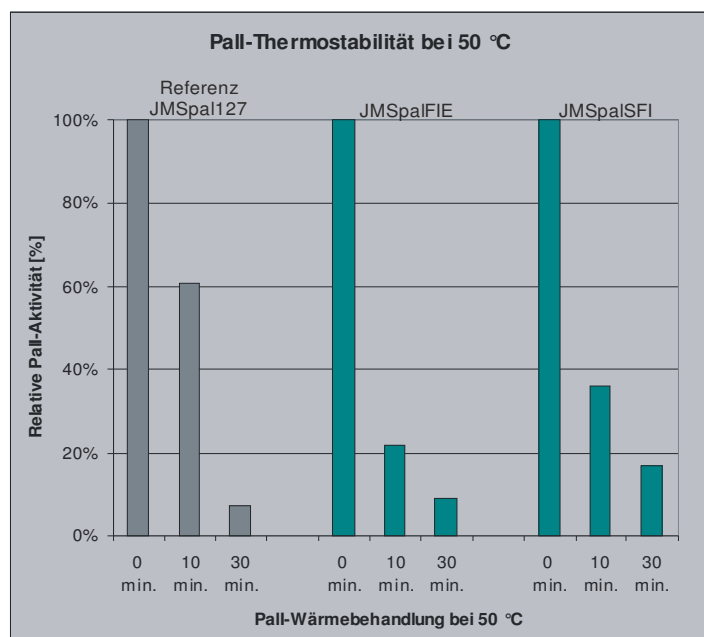
Ob und wie sich die deletierten AS auf den Reaktionsmechanismus des Pall-Enzyms auswirken, bleibt spekulativ.

#### 4.2.3.6 Pall-Thermostabilität

Die Auswirkung der eingeführten Mutationen auf die Thermostabilität des Pall-Enzyms wurde in der folgenden Versuchsreihe ermittelt. Dazu wurde das Pall-Enzym aus den rekombinanten *E. coli*-Zellen über die Zwischenschritte Kultivierung (s. Abschnitt 3.2.3) und Zellaufschluss (s. Abschnitt 3.4) in die lösliche Fraktion der Zellextrakte freigesetzt.

Die Pall-haltigen Zellextrakte wurden im Wasserbad einer Wärmebehandlung bei 50 °C unterzogen und dann auf 22,5 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrats im Verhältnis 1:1 und die Standard-Enzymaktivität wurde nach Kap. 3.5 ermittelt. Die Bezugsgröße mit 100 % ist die Pall-Aktivität der jeweiligen Zellextrakte ohne Wärmebehandlung. Die detaillierte Vorgehensweise zur Untersuchung der Thermostabilität ist dem Kap. 3.7 zu entnehmen.

Die Pall-Thermostabilität der Deletionsmutanten nach einer 10- und 30-minütigen Wärmebehandlung bei 50 °C ist vergleichend mit der Thermostabilität des Referenzstamms JMSpal127 in Abbildung 4-13 und Tabelle 4.7 gezeigt.



**Abbildung 4-13 Pall-Thermostabilität der Deletionsmutanten**

Vergleichende Analyse der Pall-Restaktivität nach einer Wärmebehandlung bei 50 °C. Die Bezugsgröße 100 % stellt die Pall-Aktivität der jeweiligen Zellextrakte ohne Wärmebehandlung dar.

**Tabelle 4.7 Pall-Thermostabilität bei 50 °C**

Stamm	Pall-Thermostabilität [%] <sup>*)</sup>	
	nach 10 min.	nach 30 min.
Referenz	61	7
JMSpalFIE	22	9
JMSpalSFI	36	17

<sup>\*)</sup> Pall-Restaktivität nach 10 bzw. 30 min. Behandlung bei 50 °C

Während die Referenz-Zellextrakte nach 10 min. noch 61 % ihrer Pall-Aktivität behalten, zeigen die beiden Pall-haltigen Zellextrakte aus den Deletionsmutanten nur noch 22 % und 36 % ihrer ursprünglichen Aktivität. Wird die Wärmebehandlung auf 30 min. verlängert, sinkt die Pall-Aktivität weiter ab. Nach 30 min. weisen die Referenz-Zellextrakte und die Zellextrakte aus JMSpalFIE eine nahezu identische Restaktivität von 7 % bzw. 9 % auf. Auch die Pall-Aktivität der Zellextrakte aus JMSpalSFI verringert sich mit einer Steigerung der Wärmebehandlungsdauer von 36 % auf 17 % der ursprünglichen Pall-Aktivität.

Die Deletionen im Bereich der Fusionsstelle am Anfang des rekombinanten Pall-Enzyms wirken sich auf die Thermostabilität des Enzyms aus. Bereits eine kurze Wärmebehandlung bei 50 °C von 10 min. verringert die Pall-Aktivität der Enzyme drastisch. Während das Referenz-Enzym bei dieser Dauer der Wärmebehandlung noch ca. 60 % seiner ursprünglichen Aktivität behält, zeigen beide Enzyme aus den Deletionsmutanten nur noch 20 – 30 % ihrer ursprünglichen Aktivität. Die Thermostabilität bei 50 °C wurde durch die Deletionen verschlechtert. Da die Thermostabilität eines Enzyms von vielen Faktoren, wie der Packungsdichte, hydrophoben Wechselwirkungen, der Loop-Stabilisierung (Vieille et al.,

1996; Zhou et al., 2008) oder des Ladungsmusters an der Proteinoberfläche (Perl et al., 2000) bestimmt wird, ist es schwierig, die Ursache für die schlechtere Thermostabilität der Enzyme aus den Deletionsmutanten zu benennen. Die Ergebnisse zeigen aber, dass die Deletion von drei AS am Anfang des rekombinanten Pall-Enzyms Einfluss auf einen oder mehrere dieser Faktoren nimmt.

#### 4.2.4 Zusammenfassung: Effekte der Deletionen auf die Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms

Die Untersuchung der Deletionsmutanten soll Aufschluss über die Effekte gezielter Manipulationen im Bereich der Fusionsstelle am Anfang des rekombinanten Pall-Enzyms auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms geben.

Dazu wurden die Pall-haltigen Zellextraktfraktionen zweier unterschiedlicher Deletionsmutanten vergleichend mit der Referenz (JMSpal127) charakterisiert. Beide Deletionsmutanten tragen eine Verkürzung am N-Terminus des rekombinanten Pall-Enzyms von drei Aminosäuren, jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Position. Dem rekombinanten Pall-Enzym aus JMSpalFIE fehlen die beiden AS des nativen Enzyms (I und E) und die letzte AS des Fusionspeptids (F). Das rekombinante Pall-Enzym aus JMSpalSFI weist dagegen eine Verkürzung des nativen Enzyms um eine AS (I) auf. Zusätzlich fehlen die letzten beiden AS des Fusionspeptids (S und F).

5'	M	T	M	I	T	P	S	F	I	E	Q	S	..	3'	Referenz JMSpal127
5'	M	T	M	I	T	P	S	Q	S				..	3'	JMSpalFIE
5'	M	T	M	I	T	P	E	Q	S				..	3'	JMSpalSFI

Beim Vergleich der Pall-Aktivitäten aus den Zellextrakten der rekombinanten Mutanten zeigten sich große Unterschiede. Während das Pall-Enzym aus JMSpalSFI ca. 77 % der Aktivität des Referenzenzym erreicht, weisen die Zellextrakte aus JMSpalFIE nur 65 % der Pall-Aktivität auf.

Die Deletion der ersten beiden AS im Pall-Enzym wirkt sich demnach stärker auf die Aktivität des Pall-Enzyms aus, als der Verlust der ersten AS allein.

Die Ursache für die niedrigere Pall-Aktivität der Deletionsmutante JMSpalSFI liegt offensichtlich in einer reduzierten spezifischen Aktivität. Die Untersuchung zur Pall-Expression ergab, verglichen mit der Referenz JMSpal127, keine Unterschiede in der exprimierten Pall-Menge. Die Expression wird demnach durch die Deletion der AS S, F und I nicht beeinträchtigt. Möglicherweise wirken sich die Deletionen dieser drei AS auf die strukturellen Eigenschaften des Pall-Enzyms aus. Eine veränderte Enzymstruktur bedingt durch den Verlust der AS S, F und I wäre eine mögliche Erklärung für die gesunkene spezifische Aktivität.

Die niedrigere Pall-Aktivität aus JMSpalFIE geht mit einer schlechteren Pall-Expression einher und/oder der Bildung instabiler Pall-Moleküle. Aus der SDS-PAGE-Analytik wurde klar, dass im Vergleich zur Referenz 75 % der exprimierten Pall-Menge vorliegen. Da die Plasmidmenge und damit die Anzahl der Expressionmatrizen in beiden Deletionsmutanten nahezu gleich waren, wird die Hypothese einer verschlechterten Expression unterstützt.

Das bedeutet, die verminderte Pall-Aktivität der Zellextrakte aus der Mutante JMSpalFIE kann mit der verringerten exprimierten Pall-Menge begründet werden.

Die Pall-Enzyme aus den beiden Deletionsmutanten tragen zwei identische Deletionen (F und I) und unterscheiden sich nur in der zusätzlichen Deletion der AS E. Der Verlust dieser AS könnte für die verschlechterte Expression in JMSpalFIE verantwortlich sein.

Beim Vergleich der Selektivität der rekombinanten Pall-Enzyme zeigten beide Deletionsmutanten eine hohe Palatinose-Ausbeute von 87,4 % bzw. 87,7 % und erreichten damit den Referenzwert. Deletionen von drei AS im Bereich der Fusionsstelle am Anfang des rekombinanten Pall-Enzyms haben keinen signifikanten Einfluss auf die maximale Pall-Ausbeute und auf die Menge der Monosaccharide Glucose und Fructose. Es konnte eine leichte Reduzierung der Trehalulose-Menge bei gleichzeitig geringfügiger Erhöhung der restlichen Zucker beobachtet werden.

Aus der Untersuchung zur Pall-Aktivität nach einer Wärmebehandlung bei 50 °C wurde der Einfluss der Deletionen auf die Thermostabilität des Pall-Enzyms deutlich. Während die Referenz-Zellextrakte nach einer Wärmebehandlung von 10 min. noch 61 % Restaktivität besitzt, sinkt die Restaktivität der Pall-haltigen Zellextrakte aus den Deletionsmutanten auf 20-30 %.

Bei einer Wärmebehandlung von 10 min. sind die Referenz-Zellextrakte deutlich thermostabiler als die beiden Zellextrakte aus den Deletionsmutanten.

Die wichtigsten Effekte der Deletionen auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms werden in folgender Auflistung noch einmal zusammengefasst:

**Tabelle 4.8 Zusammenfassende Darstellung der Effekte der Deletionen auf die Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms**

<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>	<b>JMSpalFIE</b>	<b>JMSpalSFI</b>
AS-Sequenzanfang	MTMITPSFIEQS	MTMITPSQS	MTMITPEQS
Pall-Aktivität [%]	100,0	<b>65,0</b>	<b>77,0</b>
Plasmid-Menge [%]	100,0	100,0	100,0
Pall-Menge [%]	100,0	<b>75,0</b>	92,0
Palatinose-Ausbeute [%]	87,4	87,7	87,4
Monosaccharide [%]	4,9	4,6	4,9
Trehalulose[%]	7,5	<b>6,8</b>	7,1
Pall-Thermostabilität [%] nach 10 min. bei 50 °C	61,0	<b>22,0</b>	<b>36,0</b>

## 4.3 Substitutionsmutanten

### 4.3.1 Deskription der Substitutionsmutanten

Der Hochleistungsstamm JMSpal127 sowie die Substitutionsmutanten JMSpal203, JMSpal306 und JMSpal513 wurden von Frau Schubert entwickelt, hergestellt und als akzenische Zellkulturen für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Bei der Entwicklung der Substitutionsmutanten wurden aus einem Alignment der Aminosäuresequenzen des Pall-Enzyms aus *Klebsiella* LX3, *Erwinia rhapontii* und *P. rubrum* nach dem Prinzip „Gemeinsamkeiten und Unterschiede“ 7 Aminosäure-Kandidatenstellen im Bereich AA<sub>150-360</sub> ausgewählt und als kombinierte Punktmutationen in mehreren Substitutionsmutanten gentechnisch umgesetzt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substitutionsmutanten werden im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

#### 4.3.1.1 Nomenklatur und Lokalisierung der Substitutionen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Substitutionsmutanten untersucht. An welcher Position und durch welche Substitution Aminosäuren ausgetauscht wurden, zeigt die Abbildung 4-14. Da die Substitutionen ausgehend von dem Stamm JMSpal127 eingeführt wurden, dient seine AS-Sequenz als Ausgangspunkt und wird detailliert für den entsprechenden Ausschnitt dargestellt. Identische AS wurden durch Punkte gekennzeichnet, die ausgetauschten AS wurden rot hervorgehoben.

		*	20	*	40	*	
MSpal127	:	MTMITPSFIEQSKTIPKWWKEAVFYQVYPRSFKDTNGDGIGDINGIIEKLDYLKALGIDA	:	60			
Mspal203	:	.....	:	60			
Mspal306	:	.....	:	60			
Mspal513	:	.....	:	60			
		*	80	*	100	*	
MSpal127	:	IWINPHYDSPNTDNGYDIRDYRKIMKEYGTMEDFDRLISEMKKRNMRMLIDVVINHTSDQ	:	120			
Mspal203	:	.....	:	120			
Mspal306	:	.....	:	120			
Mspal513	:	.....	:	120			
		*	140	*	160	*	
Mspal127	:	NEWFVKSKSSKDNPYRGYYFWKDAKEGQAPNNYPSFFGGSAWQKDEKTNQYYLHYFAKQQ	:	180			
Mspal203	:	H...Q.....	:	180			
Mspal306	:	H...Q.....D...R.G.D.....	:	180			
Mspal513	:	.....	:	180			
		*	200	*	220	*	
MSpal127	:	PDLNWDNPKVRQDLYAMLRFWLDKGVSGLRFDTVATYSKIPDFPNLTQQQLKNFAAEYTK	:	240			
Mspal203	:	.....	:	240			
Mspal306	:	.....	:	240			
Mspal513	:	.....	:	240			
		*	260	*	280	*	
MSpal127	:	GPNIHRYVNEMNKEVLSHYDIATAGEIFGVPLDQSIKFFDRRRDELNIAFTFDLIRLDRD	:	300			
Mspal203	:	.....	:	300			
Mspal306	:	.....	:	300			
Mspal513	:	.....P.....	:	300			
		*	320	*	340	*	
MSpal127	:	SDQRWRRKDWKLSQFRQIIDNVDRTAGHEYGWNAFFLDNHDNPRAVSHFGDDRPQWREPSA	:	360			
Mspal203	:	.....	:	360			
Mspal306	:	.....	:	360			
Mspal513	:	.....	:	360			

**Abbildung 4-14 Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des Pali-Enzyms aus JMSpal127 und Lokalisierung der eingeführten Mutationen**

Punkte markieren identische Aminosäuren. Rot hervorgehoben sind die durch Substitutionen ausgetauschten Aminosäuren. Bei dem hier dargestellten Alignment sind jeder Position 29 hinzuzuzählen, um die gleiche Nummerierung wie in „Crystal Structure Of Isomaltulose Synthase (Pali) From Klebsiella Sp. Lx3 aus der DataBase PDB–1M53“ zu erhalten.

Die molekulargenetischen Eigenschaften der Wildtyp-AS und ihre ausgetauschte AS werden in Tabelle 4.9 detailliert beschrieben. Neben dem Charakter wurden die Polarität und Acidität oder Basizität des Aminosäure-Restes sowie die Strukturformel dargestellt.



Tabelle 4.9 Molekulargenetische Charakteristiken der Substitutionsmutanten

Stamm	AS-Austausch	Strukturformel		Eigenschaften	
		WT	Mutante	WT	Mutante
JMSpal203	Asn → His			aliphatisch, polar, neutral	aromatisch, polar, schwach basisch
	Lys → Gln			aliphatisch, polar, basisch	aliphatisch, polar, neutral
JMSpal306	Gly → Asp			aliphatisch, unpolar, neutral	aliphatisch, polar, sauer
	Lys → Arg			aliphatisch, polar, basisch	aliphatisch, polar, stark basisch
	Ala → Gly			aliphatisch, unpolar, neutral	aliphatisch, unpolar, neutral
	Glu → Asp			aliphatisch, polar, sauer	aliphatisch, polar, sauer
JMSpal513	Arg → Pro			aliphatisch, polar, stark basisch	heterocyclisch, unpolar, neutral

In der Substitutionsmutante JMSpal203 erfolgte der Austausch von zwei Aminosäuren (AS). An AA<sub>150</sub> wurde die langkettige, polare und neutrale Aminosäure Asn gegen die aromatische, polare und schwach basische Aminosäure His ausgetauscht. Die zweite Substitution liegt an AA<sub>155</sub>. Dabei wurde die basische Aminosäure Lys durch die chemisch neutrale Aminosäure Gln ersetzt.

Die Substitutionsmutante JMSpal306 weist 6 Substitutionen auf, wobei die ersten beiden mit den Substitutionen aus JMSpal203 identisch sind. Zusätzlich wurden jeweils zwei Aminosäuren mit Aminosäuren anderer Eigenschaft und zwei weitere AS mit gleicher Polarität und Acidität bzw. Basizität ersetzt. Gly besitzt mit nur einem Wasserstoff-Atom den kleinsten AS-Rest, ist unpolar und neutral. Diese kleine AS wurde gegen die polare und saure AS Asp ausgetauscht. Ausserdem wurde die basische AS Lys mit der stark basischen Aminosäure Arg substituiert. Mit dem Austausch von Ala gegen Gly und Glu gegen Asp wurden AS mit den in Tabelle 4.9 betrachteten gleichen Eigenschaften (Polarität und Acidität/Basizität) ersetzt.

Den deutlichsten Unterschied in den Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäure erfährt die Mutante JMSpal513. Hier wurde eine langkettige, polare und stark basische AS (Arg) gegen eine heterocyclische, unpolare und neutrale AS (Pro) ausgetauscht.

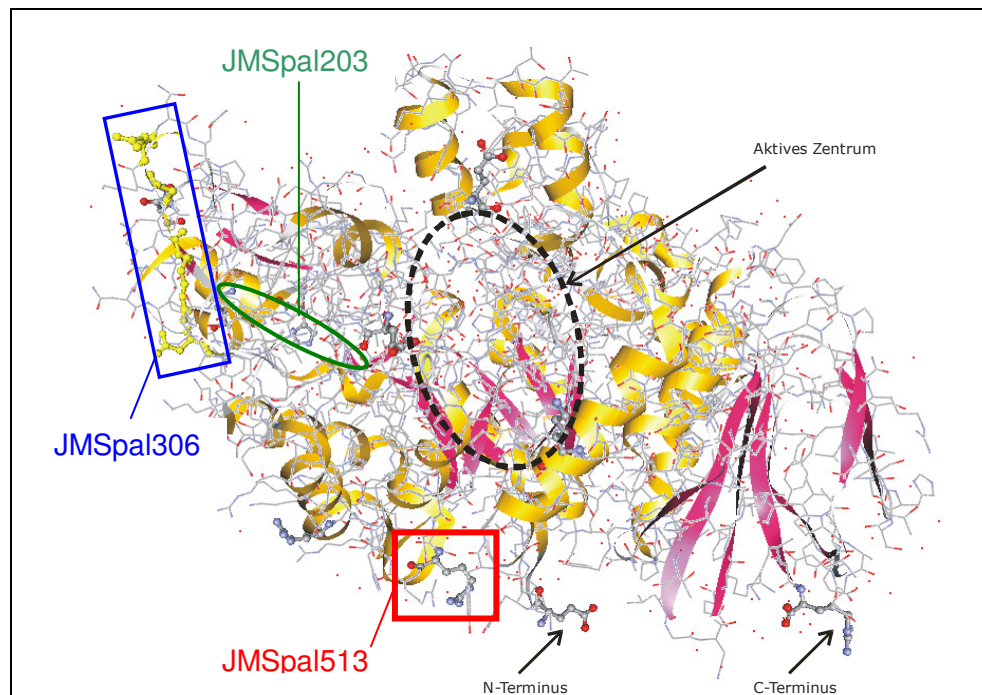
Eine Zusammenfassung der untersuchten Substitutionsmutanten und ihre Mutationen gibt die Tabelle 4.10.

**Tabelle 4.10 Die untersuchten Stämme und ihre Mutationen**

Stamm	Mutation(en)
JMSpal203	*) N150H, K155Q
JMSpal306	*) N150H, K155Q, G166D, K171R, A173G, E175D
JMSpal513	*) R310P

\*) am N-Terminus vorgesetztes Peptid: MTMITPSF

Die Lokalisierung der Substitutionen ist in der folgenden Abbildung gekennzeichnet.



**Abbildung 4-15 Pali-Raumstruktur und Lokalisierung der erzeugten Punktmutationen**

Die markierten Bereiche sind die wahrscheinlichen Positionen der untersuchten, sich bei den Mutanten JMSpal203, JMSpal306 und JMSpal513 unterscheidenden Aminosäuren. JMSpal203: **HQ-Gruppe**, JMSpal306: HQ und **DRGD-Gruppe**, JMSpal513: **P** [Quelle der Daten für die Erstellung der Raumstruktur: Crystal Structure Of Isomaltulose Synthase (Pali) From Klebsiella Sp. Lx3 aus der DataBase PDB–1M53].

Der *pall*-kodierende Bereich aller 3 untersuchten Substitutionsmutanten wurde vollständig sequenziert und die Richtigkeit der gezielten Punktmutationen verifiziert. Sequenziert wurden jeweils beide Stränge im Bereich des offenen Pali-Leserasters (ORF) aus zwei unabhängigen Plasmid-Präparationen und Kulturen. Die vollständige Nukleotidsequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuren sind dem Anhang zu entnehmen.

#### 4.3.2 Untersuchung zur Voraussage von Effekten definierter Mutationen in homologen Enzymen

Obwohl einige Enzymstrukturen bereits aufgeklärt und in den Datenbanken eine große Anzahl an Nukleotidsequenzen verwandter Enzyme verfügbar sind, ist die Verbesserung eines Enzyms auf molekulargenetischer Ebene schwer voraus zu sagen. Eine allgemein gültige Regel, welche Aminosäure durch eine andere ausgetauscht werden kann, um einen bestimmten Effekt im Enzym auszulösen, gibt es nicht. Eine Veränderung der AS-Sequenz kann mannigfaltige Auswirkung auf ein Enzym haben (Veränderung des Ladungsmusters, der Raumstruktur oder des katalytischen Zentrums) und diese Veränderung vorherzusehen oder gar auf andere Enzyme zu übertragen, ist kaum möglich.

Um diese Sachverhalte zu verdeutlichen, wurden Mutationen an exakt der gleichen Position in das rekombinante Pall-Enzym aus *P. rubrum* eingeführt, die bereits in einem anderen, homologen Pall-Enzym aus *Klebsiella* eine verbesserte Enzymeigenschaft hervorgebracht haben.

Aus den Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe Zhang (Zhang et al., 2002) geht hervor, dass das Pall-Enzym aus *Klebsiella sp. LX3* eine sehr geringe Thermostabilität besitzt. So beträgt die Halbwertszeit dieses Enzyms bei 50 °C 1,8 min. Durch die Einführung zweier zufälliger Punktmutationen konnten sie die Halbwertszeit auf 19,8 min steigern. Ausgetauscht wurden an Position 310 die Aminosäure Arginin gegen Prolin (R310P) und an Position 498 die Aminosäure Glutaminsäure gegen Prolin (E498P). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass sich durch die Prolin-Substitution von potentiellen Aminosäuren die Thermostabilität des Enzyms beeinflussen lässt.

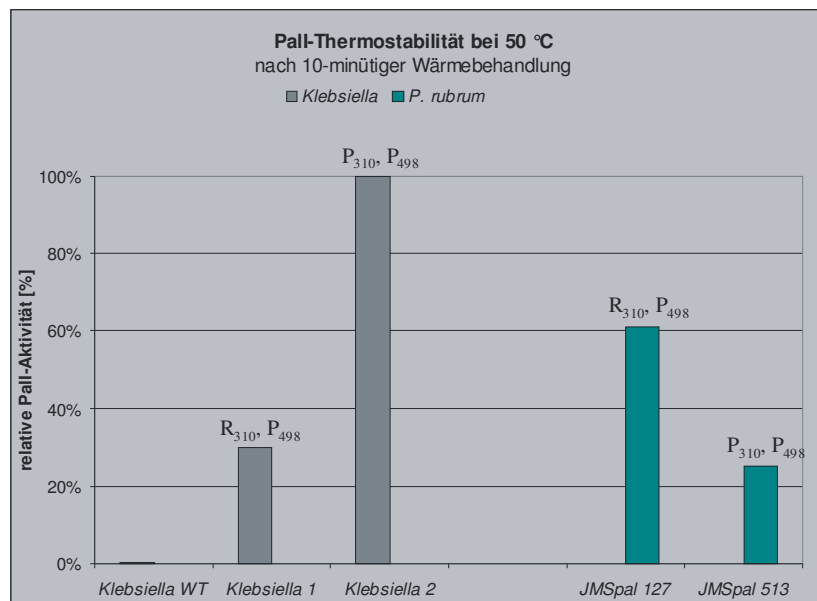
Da die beiden Enzyme aus *P. rubrum* und *Klebsiella sp. LX3* eine Homologie von 80 % auf dem AA-Niveau aufweisen, bieten sich diese beiden Stämme für die Untersuchung der Übertragbarkeit einer Prognose zur zielgerichteten Mutagenese an. Die *P. rubrum*-Mutante JMSpa1513 wurde erzeugt, um die verbesserte Thermostabilität zu überprüfen. Sie trägt an den kritischen Positionen die gleichen Aminosäuren wie die thermostabile *Klebsiella*-Mutante.

Wie sich diese Prolin-Substitution auf die Thermostabilität bei 50 °C auswirkt, ist mit der Thermostabilität der *Klebsiella*-Mutante in Tabelle 4.11 und Abbildung 4-16 vergleichend dargestellt.

**Tabelle 4.11 Vergleich der Thermostabilität**

Pall-Enzym	Pall-Restaktivität [%] nach 10-minütiger Wärmebehandlung bei 50 °C	Aminosäuren
<i>Klebsiella</i> WT*	0	R <sub>310</sub> , E <sub>498</sub>
<i>Klebsiella</i> 1*	30	R <sub>310</sub> , P <sub>498</sub>
<i>Klebsiella</i> 2*	100	P <sub>310</sub> , P <sub>498</sub>
JMSpal127	61	R <sub>310</sub> , P <sub>498</sub>
JMSpal513	25	P <sub>310</sub> , P <sub>498</sub>

\* Daten aus (Zhang et al., 2002)

**Abbildung 4-16 Vergleichende Pall-Thermostabilität**

Graue Balken zeigen die Pall-Restaktivitäten der *Klebsiella*-Mutanten aus (Zhang et al., 2002), blau-grüne Balken spiegeln die Pall-Restaktivität der *P. rubrum*-Mutanten wider, die in dieser Arbeit ermittelt wurden. Die jeweiligen AS an den kritischen Positionen wurden vermerkt.

Auffällig ist, dass bereits die einzelne Substitution von Glu zu Pro an der Position 498 (E498P) in den beiden unterschiedlichen Mutanten-Stämmen (*Klebsiella* 1 verglichen mit JMSpal127) ein anderes Verhalten bzgl. der Thermostabilität zeigt. Die *Klebsiella*-Mutante 1 weist eine relative Pall-Aktivität von ca. 30 % auf, im Gegensatz erzielt die *P. rubrum*-Mutante JMSpal127 noch ca. 60 % ihrer ursprünglichen Pall-Aktivität.

Die Mutanten *Klebsiella* 2 und JMSpal513 tragen an den kritischen Positionen (AA<sub>310</sub> und AA<sub>498</sub>) die gleichen Aminosäuren (Pro), zeigen aber ein ganz unterschiedliches Verhalten in der Thermostabilität. Während der jeweilige Austausch R310P und E498P in der *Klebsiella*-Mutante eine Verbesserung der Thermostabilität um 10 Minuten bewirkt, verliert die *P. rubrum*-Mutante JMSpal513 an Restaktivität und zeigt nur noch 25 % ihrer ursprünglichen Pall-Aktivität.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine zielgerichtete Mutagenese an der gleichen Position in zwei eng verwandten Enzymen ganz unterschiedliche Auswirkung hat. Konnte mit der Substitution von Pro im Pall-Enzym aus *Klebsiella* eine Steigerung der Thermostabilität

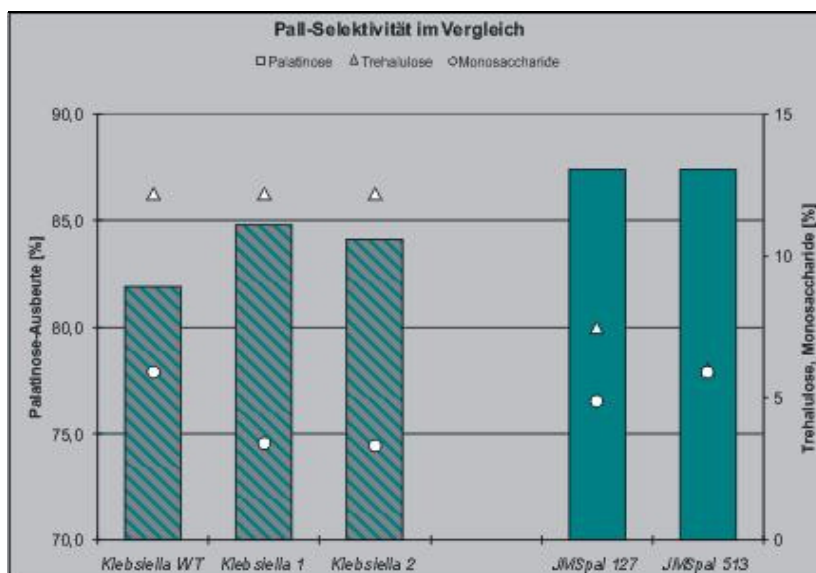
erreicht werden, führt die gleiche Substitution im Pall-Enzym aus *P. rubrum* zu einer signifikanten Verschlechterung der Thermostabilität.

Es ist nicht nur entscheidend, dass die Substitution an der gleichen Position im Enzym liegt, vielmehr ist die Interaktion zwischen der ausgetauschten AS und den anderen AS im Molekül bedeutend.

Jedoch lassen die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Pall-Thermostabilität der beiden Mutanten vermuten, dass entscheidende Strukturunterschiede vorliegen. Obwohl an den gleichen Positionen (310 und 498) im Enzym die AS Pro zu finden sind, interagieren sie wahrscheinlich mit anderen AS und bilden andere Raumstrukturen aus. Bei thermostabilen Enzymen bleibt auch bei hohen Temperaturen die geordnete Raumstruktur, Voraussetzung für eine korrekte Funktion des Enzyms, erhalten. Die verschlechterte Thermostabilität der *P. rubrum*-Mutante lässt den Schluss zu, dass die Substitutionen von Pro zu einer veränderten Raumstruktur führten und so die Funktion des Pall-Enzyms beeinträchtigt wurde.

In der Veröffentlichung von Zhang et al., 2002 zur *Klebsiella*-Mutante wurde außerdem ein Einfluss der Pro-Substitution auf die Enzym-Selektivität bzw. auf das Produktspektrum des Pall-Enzyms beschrieben und diskutiert. Vergleichend dazu wurden die Produktspektren für die *P. rubrum*-Mutanten ausgewertet. In

Abbildung 4-17 und Tabelle 4.12 sind die Ergebnisse zur Pall-Selektivität der beiden unterschiedlichen Mutanten zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 4-17 Vergleichende Analyse der Pall-Selektivität**

Die max. Palatinose-Ausbeute der *Klebsiella*-Mutanten ist in grau-schraffierten Balken (Zhang et al., 2002), die der *P. rubrum*-Mutante in blau-grünen Balken (diese Arbeit) dargestellt.

Aus den Daten der AG Zhang (Zhang et al., 2002), links in der Abbildung 4-17, wird deutlich, dass die AS-Substitutionen in den *Klebsiella*-Mutanten an den Positionen 310 und 498 eine

Änderung des Produktspektrums bewirken. Während sich die maximale Palatinose-Ausbeute signifikant von 81,9 % auf 84,8 % bzw. 84,4 % erhöht, verringert sich gleichzeitig die Menge der Monosaccharide von ca. 6 % auf 3,4 % bzw. 3,3 %. Die Menge an Trehalulose bleibt in beiden *Klebsiella*-Mutanten konstant bei etwa 12 %. Vergleicht man die Werte der *Klebsiella 1* mit den Werten aus *Klebsiella 2*, so scheint die Substitution von Pro an Position 310 (R310P) keinen Einfluss auf die Selektivität des Pall-Enzyms zu nehmen.

Die gleichen AS-Substitutionen wirken sich auf die Pall-Selektivität in den *P. rubrum*-Mutanten anders aus. Die Substitution von Pro an Position 310 in JMSpal513 bewirkt eine signifikante Reduzierung der Trehalulose-Menge bei gleichzeitiger Erhöhung der Menge an Monosacchariden.

**Tabelle 4.12** Pall-Selektivität von *Klebsiella*- und *P. rubrum*-Mutanten

Pall-Enzym	Pall-Selektivität			AS
	Palatinose [%]	Trehalulose [%]	Monosaccharide [%]	
<i>Klebsiella</i> WT*	81,9 ± 1,0	12,2	5,9	R <sub>310</sub> , E <sub>498</sub>
<i>Klebsiella 1</i> *	84,8 ± 1,0	12,2	3,4	R <sub>310</sub> , P <sub>498</sub>
<i>Klebsiella 2</i> *	84,4 ± 2,0	12,2	3,3	P <sub>310</sub> , P <sub>498</sub>
JMSpal127	87,4 ± 0,2	7,5	4,9	R <sub>310</sub> , P <sub>498</sub>
JMSpal513	87,4 ± 0,2	6,0	5,9	P <sub>310</sub> , P <sub>498</sub>

\* Daten aus (Zhang et al., 2002)

Die gleichen Punktmutationen haben in den beiden verwandten Pall-Enzymen aus *Klebsiella* und *P. rubrum* eine unterschiedliche Wirkung auf das Produktspektrum der jeweiligen Enzyme. Während in *Klebsiella* der Austausch der AS R310P zu keiner signifikanten Änderung im Produktspektrum führt, verändert sich in *P. rubrum* das Spektrum der Nebenprodukte signifikant durch die gleiche AS-Substitution.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Thermostabilität und der Enzym-Selektivität zeigen, dass die Wirkung einer Punktmutation schwer vorhersagbar bleibt und dass sich Effekte, die eine Mutation in einem Pall-Enzym bewirkt, nicht von einem Molekül auf ein anderes übertragen lassen. Entscheidend sind die Wechselwirkungen, die AS mit anderen AS im Enzym eingehen und so zu Raumstrukturen eines Proteins führen.

### 4.3.3 Auswirkung der Substitutionen auf die Eigenschaften des rekombianten Pall-Enzyms

Wie bereits für die Deletionsmutanten untersucht, erfolgte eine Charakterisierung der Substitutionsmutanten bezüglich ihrer physiologischen Eigenschaften. Verglichen wurden diese Ergebnisse jeweils mit dem Referenz-Stamm JMSpal127.

Die drei Substitutions-Stämme sowie der Referenz-Stamm JMSpal127 wurden in YeGly10-Medium unter Standardbedingungen (siehe Kap. 3.2) kultiviert. Der Erntezeitpunkt wurde aus der Aufnahme des Wachstumsverhaltens im YeGly10-Medium wie in Kap. 4.1.2 bestimmt und lag bei 19 h.

Mit einem Zellaufschluss nach Kap. 3.4 wurden die rekombinanten Pall-Enzyme in die löslichen Zellfraktion freigesetzt.

Für die Charakterisierung der Pall-Enzyme wurden folgende Eigenschaften analysiert:

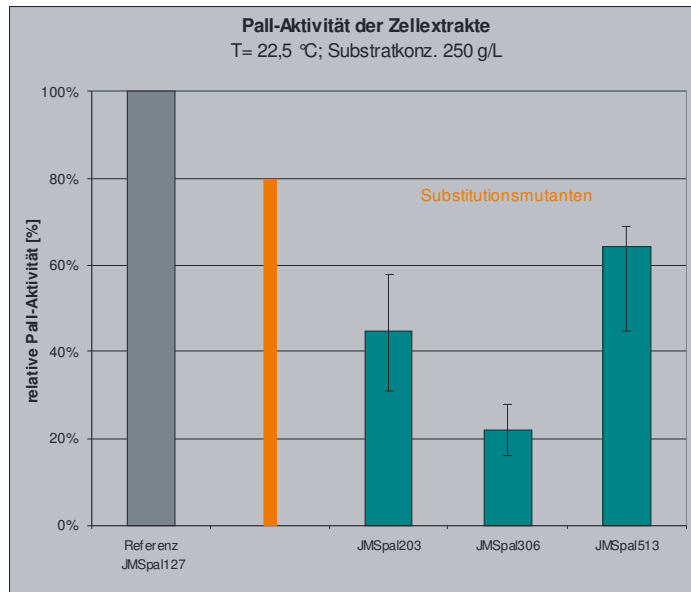
- Pall-Aktivität der Zellextrakte
- Pall-Expression
- Pall-Selektivität
- Pall-Thermostabilität bei 50 °C

#### 4.3.3.1 Pall-Aktivität der Zellextrakte

Nach einem 1. Screening auf Pall-Aktivität in 5-mL-Kulturröhrchen, wurden Klone der unterschiedlichen Substitutionsmutanten im 50-mL-Maßstab jeweils im Doppelansatz bei 37 °C und 150 rpm für ca. 19 h kultiviert. Alle in dieser Versuchsreihe verglichenen Pall-Enzyme stammen aus Zellextrakten, die aus 50 mL-Kulturen semiquantitativ identisch mit einer End-OD<sub>600</sub> von  $2,3 \pm 0,3$  hergestellt wurden.

Die Bestimmung der Pall-Aktivitäten der Zellextrakte erfolgte nach Kap. 3.5.

In Abbildung 4-18 und Tabelle 4.13 sind die Mittelwerte der Aktivitäten der drei Substitutionsmutanten und der Referenz aus 4 unabhängigen Versuchsreihen dargestellt. Für eine vergleichende Analyse wurde die ermittelte Pall-Aktivität der Referenz-Zellextrakte auf 100 % gesetzt und die Pall-Aktivitäten der Zellektrakte aus den Substitutionsmutanten jeweils auf diesen Basiswert bezogen.



**Abbildung 4-18** Relative Pall-Aktivitäten der Substitutionsmutanten in Bezug auf die Referenz JMSpal127

**Tabelle 4.13** Pall-Aktivität der Zellextrakte aus den Substitutionsmutanten

Stamm	Mittelwerte der relative Pall-Aktivität [%]	Mutation(en)
Referenz	100	Ins(MTMITPSF <sub>-8</sub> )
JMSpal203	45 ± 13	Ins(MTMITPSF <sub>-8</sub> ) + N150H, K155Q
JMSpal306	22 ± 7	Ins(MTMITPSF <sub>-8</sub> ) + N150H, K155Q, G166D, K171R, A173G, E175D
JMSpal513	64 ± 19	Ins(MTMITPSF <sub>-8</sub> ) + R310P

Alle drei Pall-Enzyme aus den Substitutionsmutanten zeigen deutlich niedrigere Pall-Aktivitäten als die Zellextrakte der Referenz (JMSpal127).

JMSpal306 trägt mit 6 Substitutionen die meisten Punktmutationen und verliert am meisten an Pall-Aktivität. Verglichen mit der Referenz enthielten die Zellextrakte aus JMSpal306 noch 22 % der Pall-Aktivität.

Auch die anderen beiden Pall-haltigen Zellextrakte der Substitutionsmutanten verlieren gegenüber der JMSpal127 an Aktivität.

Sowohl JMSpal203, bei der die Aminosäuren N150H und K155Q ausgetauscht wurden, als auch JMSpal513 mit nur einem Aminosäureaustausch von R310P, verlieren an Pall-Aktivität. Die Zellextrakte aus JMSpal203 erreichen 45 % der Pall-Aktivität und JMSpal513 erreicht 64 % der Referenz. JMSpal203 und JMSpal306 tragen zwei identische AS-Substitutionen. Durch diese beiden Austausche wurde die Pall-Aktivität in JMSpal 203 auf 45 % reduziert. Die vier zusätzlichen Substitutionen G166D, K171R, A173G, E175D in JMSpal306 halbieren die Pall-Aktivität der Zellextrakte erneut.



Aus den Aktivitätswerten der Zellextrakte aus JMSpal513 wird deutlich, dass bereits der Austausch einer einzigen AS die Aktivität eines Enzyms beeinflusst. Statt der langkettigen, polaren und stark basischen AS Arginin befindet sich nun an der Position 310 im Pall-Enzym die heterozyklische, unpolare und neutrale AS Prolin. Die drastische Veränderung der Eigenschaft einer einzigen AS im Pall-Enzym führt zu einem Verlust der Aktivität, nur noch 64 % der Referenz-Aktivität werden erreicht.

Aus Abbildung 4-15 wird ersichtlich, dass die Substitutionen an verschiedenen Positionen im Enzym zu finden sind. Trotzdem wirken sich alle negativ auf die Aktivität des Pall-Enzyms aus.

Wie bereits in Kap. 4.2.3.1 erläutert, muss die Reduzierung der Pall-Aktivitäten in den Zellextrakten der Substitutionsmutanten nicht zwangsläufig bedeuten, dass tatsächlich die Enzym-Aktivität vermindert wurde. Die Gründe für die reduzierten Pall-Aktivitäten der Zellextrakte wurden auf drei verschiedenen Ebenen der Enzymcharakterisierung betrachtet:

1. auf Ebene der Enzymfunktion: die Ermittlung der spezifischen Aktivität gibt einen Hinweis auf eine verschlechterte Funktionalität des Pall-Enzyms.
2. auf Ebene der Pall-Expression: die semiquantitative Analyse der exprimierten Pall-Menge zeigt, ob eine verschlechterte Expression der Pall-Enzyme vorliegt und/oder weist auf eine mögliche Instabilität der Pall-Moleküle hin.
3. auf Ebene der Plasmide: Die vergleichende Analyse der Plasmidanzahl stellt dar, ob die reduzierten Pall-Moleküle auf die Anzahl der Expressionmatrizen und damit auf den Ausgangspunkt der Expression zurück zu führen sind.

Alle drei Aspekte wurden durch vergleichende Analysen der Pall-Expression im folgenden Abschnitt behandelt.

#### 4.3.3.2 Untersuchung der Pall-Expression

Die Analyse der spezifischen Aktivität erfolgt aus der Ermittlung der Pall-Aktivität pro mg Pall. Eine semiquantitative Erfassung der gebildeten Pall-Menge ist mit Hilfe der SDS-PAGE-Analytik möglich. Mit dieser Methode kann das Pall-Enzym sichtbar gemacht werden, so dass eine semiquantitative Schätzung der gebildeten Pall-Menge möglich ist. Zusammen mit der Bestimmung von Proteinkonzentration und Enzymaktivität lässt sich so auch ein umfassendes Bild zur heterologen Pall-Expression erstellen.

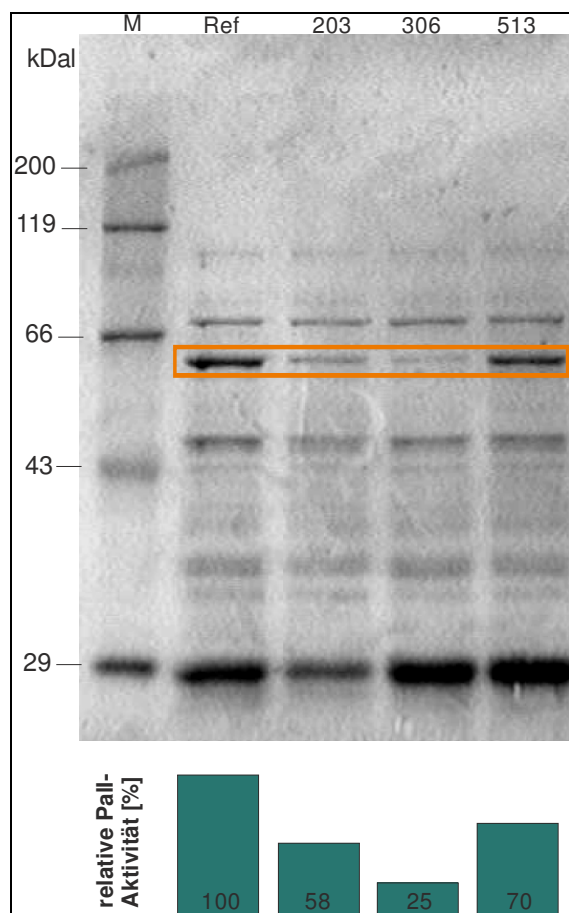
Ausgangspunkt der Pall-Expression ist die Expressionsmatrize. Die Expression des Pall-Enzyms findet in *E. coli* am Lac-Promoter eines high-copy-number-Plasmids statt

(s. Kap. 3.1). Die Anzahl der Expressionmatrize wird durch die Plasmid-Menge bestimmt. Mit einer semiquantitativen Ermittlung der Plasmid-Menge kann auf die zur Verfügung stehende Anzahl der Expressionsmatrizen geschlossen werden.

#### 4.3.3.3 Semiquantitative Erfassung der Pall-Menge durch SDS-PAGE-Analytik

Die Visualisierung des Pall-Enzyms erfolgte mittels SDS-PAGE-Analytik. Dazu wurden die löslichen Fraktionen der Zellextrakte aus den Substitutionsmutanten vergleichend mit den Referenz-Zellextrakten der Größe nach getrennt (s. Kap. 3.3.5). Alle in dieser Versuchsreihe verglichenen Zellextrakte entstammen Stämmen, die unter identischen Bedingungen kultiviert wurden und erreichten eine End-OD<sub>600</sub> von  $2,3 \pm 0,1$ .

Das Pall-Enzym ist als 67 kDal-Bande sichtbar. Die Menge des exprimierten Pall-Enzyms wurde aus der Bandenintensität der SDS-PAGE mit dem Programm *Totallab* semiquantitativ ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-19 und Tabelle 4.14 dargestellt.



**Abbildung 4-19 Vergleichende Analyse der Pall-Expression und dazugehörige, schematisch dargestellte relative Pall-Aktivitäten**

Die Proben wurden vor dem Zellaufschluss 2fach aufkonzentriert und auf dem 10 %igen SDS-Gel bei 123 V aufgetrennt. Pro Tasche wurden 14 µl Probe aufgetragen; die Markerbande von 66 kDa entspricht einer Masse von 1 µg Protein. Die Pall-Bande ist rot umrahmt.

**Tabelle 4.14 Semiquantitative Berechnung der Pall-Menge aus SDS-PAGE**

	Referenz	JMSpal203	JMSpal306	JMSpal513
<b>relative Menge an löslichen Protein [%]</b>	100	100	90	100
<b>Pall-Menge [%]</b>	100	<b>70</b>	<b>58</b>	88
<b>Pall-Anteil am löslichen Protein [%]</b>	100	63	63	80
<b>relative Pall-Aktivität [%]</b>	100	58	<b>25</b>	<b>70</b>

Bereits aus der farblich hervorgehobenen Pall-Bande in Abbildung 4-19 ist erkennbar, dass JMSpal203 und JMSpal306 signifikant weniger Pall-Enzym exprimieren als die Referenz. Verglichen mit der Referenz JMSpal127 exprimiert JMSpal203 70 % und JMSpal306 58 % an Pall. In JMSpal513 wird mit 88 % ebenfalls eine leichte Reduzierung der exprimierten Pall-Menge beobachtet.

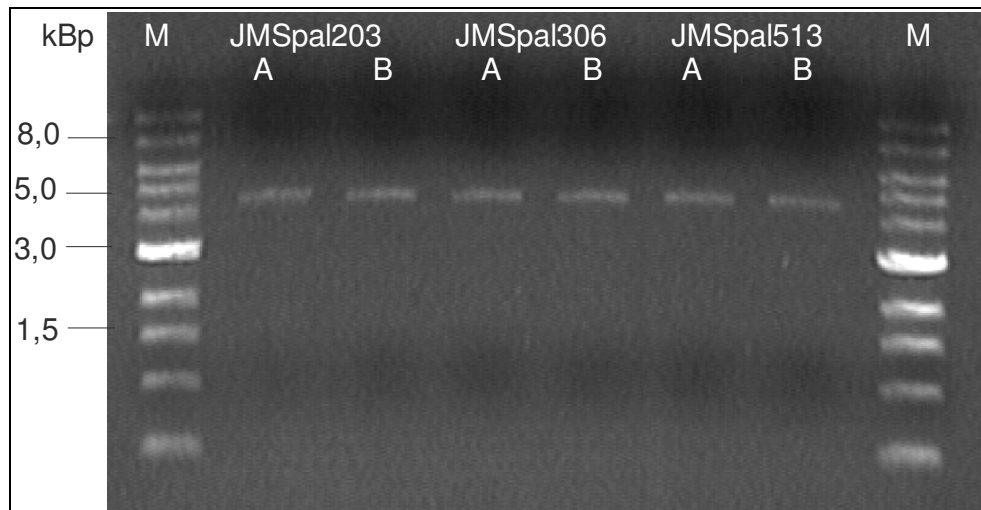
Aus der ermittelten Pall-Menge lässt sich die spezifische Pall-Aktivität semiquantitativ abschätzen. Die spezifische Pall-Aktivität der Zellextrakte aus JMSpal306 liegt bei 50 % der Referenz-Werte und ist damit deutlich niedriger. Die Zellextrakte der JMSpal203 erreichen in etwa eine spezifische Pall-Aktivität von 87 %. Für die Substitutionsmutante JMSpal513 ergibt sich eine reduzierte spezifische Pall-Aktivität. Im Vergleich zur Referenz werden 78 % erreicht.

Die sich anschließende vergleichende Analyse der Plasmidanzahl soll zeigen, in wie weit sich die reduzierte Pall-Menge mit einer reduzierten Anzahl der Expressionsmatrizen begründet.

#### 4.3.3.4 Ermittlung der relativen Kopienzahl der Plasmide

Um die Anzahl der Expressionsmatrizen, die in den Zellen der Substitutionsmutanten enthalten sind, beurteilen zu können, erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA. Dazu wurde die Plasmid-DNA isoliert, mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut und semiquantitativ untersucht.

Die Kultivierung aller in dieser Versuchsreihe verglichenen Stämme erfolgte unter identischen Bedingungen in 5-mL-Kulturröhrchen mit einer End-OD<sub>600</sub> von  $1,2 \pm 0,2$ .



**Abbildung 4-20 Isolierte Plasmid-DNA der Substitutionsmutanten im Doppelansatz A und B**

M: Längenstandard 1 kb, 0,5 µg; jeweils 1,5 µl Plasmid-DNA aus einer Standard-Präparation (s. Kap. 3.3.3) wurden aufgetragen.

Nach einem Verdau der Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *HindIII* und der elektrophoretischen Auftrennung im Gel ist in allen Spuren eine Bande der Größe ~ 4,4 kBp erkennbar. Aufgrund der Intensität der Bande kann die relative Plasmidmenge semiquantitativ abgeschätzt werden. Abbildung 4-20 zeigt eine annähernd gleich intensive Bande in den jeweiligen Doppelansätzen (A und B) wie auch in den Spuren der unterschiedlichen Substitutionsmutanten. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass in allen drei Substitutionsmutanten die gleiche Plasmidmenge und damit die gleiche Anzahl an Expressionsmatrizen vorhanden sind. Die Ursache für die niedrigen exprimierten Pall-Mengen liegt demzufolge nicht in der Plasmidmenge, dem Ausgangspunkt für die Fremdexpression der Pall-Enzyme.

Einer oder beide AS-Substitutionen aus der Gruppe H150, Q155 (Mutante JMSpal203) bewirken eine Reduktion der exprimierten Menge des Pall-Enzyms in den Zellextrakten. Dieser Effekt wird durch die Gruppe D166, R171, G173, D175 (Mutante JMSpal306) verstärkt. Diese verminderte exprimierte Molekül-Menge führt in der Substitutionsmutante JMSpal203 zu der verschlechterten Pall-Aktivität in den Zellextrakten.

Neben einer reduzierten Expression ist die D166, R171, G173, D175-Gruppe scheinbar auch für eine Herabsetzung der spezifischen Pall-Aktivität verantwortlich. In der Substitutionsmutante JMSpal306 liegt offensichtlich sowohl eine herabgesetzte Expressionsrate, als auch die Expression inaktiver Pall-Moleküle vor. Beide Aspekte führen zu der erheblichen Aktivitätsreduzierung in den Zellextrakten.

Auch der alleinige AS-Austausch von R310P in JMSpal513 bewirkt eine leichte Reduzierung der Expressionsrate. Die spezifische Pall-Aktivität ist ebenfalls reduziert. Die niedrigere Pall-Aktivität der Zellextrakte aus JMSpal513 lässt sich mit der Bildung inaktiver Pall-Moleküle erklären. Es wäre möglich, dass sich beide Substitutionsgruppen (N150H, K155Q, G166D,

K171R, A173G, E175D für JMSpal306 und R310P für JMSpal513) auf die Tertiärstruktur des Pall-Enzyms auswirken. Die Entstehung instabiler und/oder inaktiver Pall-Moleküle durch eine veränderte Faltung des Pall-Enzyms könnte mit dem Aktivitätsverlust begründet werden.

#### 4.3.3.5 Pall-Selektivität

Für die Untersuchung der Pall-Selektivität der Substitutionsmutanten wurden die Produktspektren der einzelnen Mutanten als Kinetiken für den gesamten Verlauf der Enzymreaktion aufgenommen. Neben den Pall-Enzymen aus den drei Substitutionsmutanten wurde die Selektivität des Referenz-Enzym aus JMSpal127 vergleichend hinzugezogen. Die Aufnahme der Produktspektren erfolgte wie in Kap. 3.6 und Kap. 4.1.3 erläutert und wurde aus mindestens vier unabhängigen Messungen gemittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-21 zusammenfassend dargestellt. Tabelle 4.15 gibt die konkreten Zahlenwerte an.

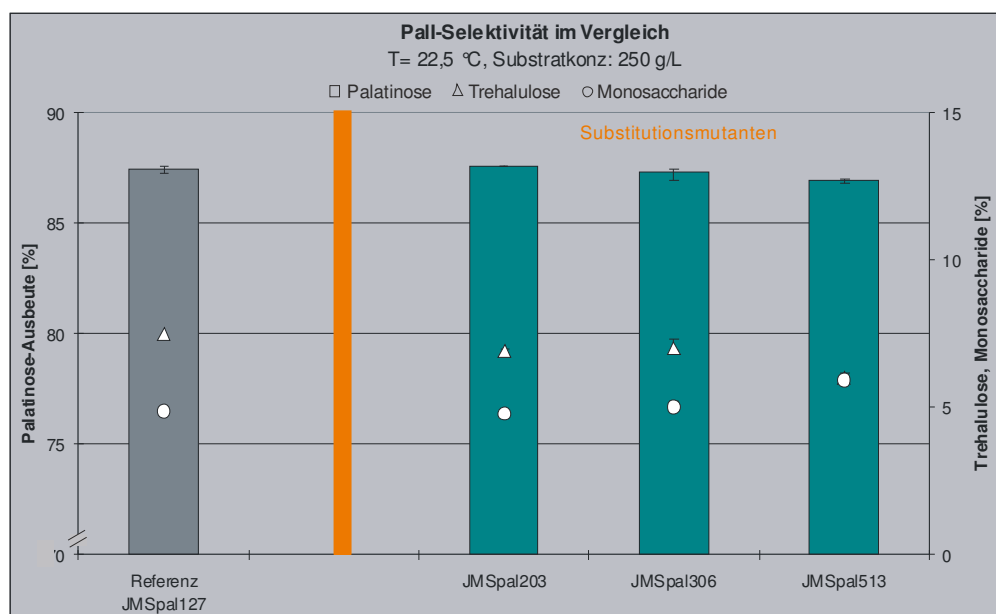


Abbildung 4-21 Pall-Selektivität im Vergleich

Tabelle 4.15 Pall-Selektivität im Vergleich

Stamm	Palatinose*	Trehalulose*	Monosaccharide*	Rest
	[%]	[%]	[%]	[%]
Referenz	87,4 ± 0,2	7,5	4,9	0,1
JMSpal203	87,6 ± 0,0	6,9 ± 0,3	4,8 ± 0,3	0,7
JMSpal306	87,3 ± 0,6	7,0 ± 0,4	5,0 ± 0,3	0,7
JMSpal513	87,4 ± 0,2	6,0 ± 0,4	5,9 ± 0,1	1,2

\* Mittelwerte aus 4 unabhängigen Messungen

Wie aus Tabelle 4.15 zu erkennen ist, zeigen die Substitutionsmutanten JMSpal203 und JMSpal306 ein sehr ähnliches Produktspektrum. Mit 87,6 % und 87,3 % stellt Palatinose das

Hauptprodukt dar. Als Nebenprodukte werden Trehalulose (7 %) und die beiden Monosaccharide Glucose und Fructose (zusammen ca. 5 %) gebildet.

Damit entspricht das Produktspektrum der beiden Substitutionsmutanten dem der Referenz JMSpal127.

Die eingeführten Punktmutationen in JMSpal203 und JMSpal306 wirken sich weder auf die maximale Palatinose-Ausbeute noch auf die Menge der Nebenprodukte aus.

Die Substitutionsmutante JMSpal513 hingegen zeigt eine signifikante Verschiebung im Produktspektrum. Während die Trehalulose-Menge von 7,5 % auf 6,0 % reduziert wird, steigt die Menge an Monosacchariden von ca. 5 % auf 6 % an. Innerhalb der Monosaccharide erhöht sich vor allem der Fructose-Anteil (von 2,6 % auf 3,2 %). Zusätzlich ergibt sich eine Steigerung in der Menge der restlichen Zucker. Die maximale Palatinose-Ausbeute wird nicht signifikant beeinflusst und erreicht mit 87,4 % in etwa den Referenzwert.

Die zwei ausgetauschten AS aus JMSpal203 (N150H und K155Q) sowie auch die vier weiteren Substitutionen in JMSpal306 (G166D, K171R, A173G und E175D) sind gemeinsame Aminosäuren aus *E. rhapsodici* und *Klebsiella* LX3, die eine andere Zusammensetzung des Pall-Produktspektrums besitzen (siehe Tabelle 4.16).

**Tabelle 4.16 Pall-Produktspektrum**

<b>Stamm</b>	<b>Palatinose [%]</b>	<b>Trehalulose [%]</b>
<i>P. rubrum</i>	85	8
<i>E. rhapsodici</i>	85	15
<i>Klebsiella</i> LX3	83	12

Mit 15 % bzw. 12 % bilden die Pall-Enzyme aus diesen beiden Stämmen deutlich mehr an Trehalulose. Die maximale Palatinose-Ausbeute beträgt 85 % bzw. 83 % (Bornke et al., 2001; Zhang et al., 2002). Die Substitution dieser zwei bzw. sechs AS in den *P. rubrum*-Mutanten JMSpal203 und JMSpal306 bewirkt keine Veränderung im Produktspektrum. Sowohl die maximale Palatinose-Ausbeute, wie auch die Mengen der Nebenprodukte ändern sich nicht. Daraus lässt sich schließen, dass die Punktmutationen H150, Q155 in JMSpal203 und die D166, R171, G173, D175 in JMSpal306 keinen Einfluss auf die Selektivität des Pall-Enzyms nehmen.

Eine einzige AS-Substitution (R310P) hat einen signifikanten Einfluss auf die Selektivität des Pall-Enzyms. Mit dem Austausch der polaren und stark basischen AS Arginin zur unpolaren und neutralen AS Prolin wird eine Aminosäure mit völlig unterschiedlichen Eigenschaften ersetzt. Diese veränderte Eigenschaft einer AS wirkt sich auf die Eigenschaft des gesamten Pall-Enzyms aus. Die Zusammensetzung der Nebenprodukte Trehalulose und der

Monosaccharide ändert sich signifikant, die maximale Palatinose-Ausbeute bleibt unverändert.

In einigen Publikationen wird die konservierte AS-Sequenz 325RLDRD329 für die Produktspezifität der Isomaltulose-Synthase verantwortlich gemacht (Lee et al., 2008; Zhang et al., 2003b). Mutationen in diesem hoch konservierten Motif erhöhten den Trehalulose-Anteil und ließen die Palatinose-Menge sinken (Zhang et al., 2003b). Das Ergebnis der Mutante JMSpal513 zeigt, dass scheinbar nicht nur diese Region an der Produktbildung von Pall involviert ist. Die Substitution von R310P wirkt sich vor allem auf die Bildung der Nebenprodukte aus, während die Palatinose-Menge nicht beeinträchtigt wird. Das lässt den Schluss zu, dass die AA<sub>310</sub> im Pall-Enzym aus *P. rubrum* eine bedeutende Rolle im Reaktionsmechanismus spielt und dort möglicherweise die Fructosebildung beeinflusst. Eine Auswirkung der AS-Substitution auf die Struktur des Pall-Enzyms wäre ebenfalls möglich. Inwieweit sich der AS-Austausch von R310P auf die Enzymstruktur auswirkt ist allerdings nur spekulativ. Für genauere Aussagen wären weiterführende Analysen notwendig, die sowohl den zeitlich als auch den thematischen Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten.

#### 4.3.3.6 Untersuchung zur Thermostabilität der Substitutionsmutanten

Die Untersuchung der Thermostabilität soll zeigen, ob die unterschiedlichen AS-Substitutionen der rekombinanten Substitutionsmutanten einen Einfluss auf die Thermostabilität ausüben. Dazu wurden die löslichen Fraktionen der Pall-haltigen Zellextrakte für eine definierte Zeit im Wasserbad bei 50 °C inkubiert, dann rasch auf 22,5 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrats im Verhältnis 1:1 (Endkonzentration: 250 g/L Saccharose) und die Standard-Enzymaktivität wurde nach Kap. 3.5 ermittelt.

Bezugsgröße mit 100 % ist die Pall-Aktivität der jeweiligen Zellextrakte ohne Wärmebehandlung. Die detaillierte Vorgehensweise zur Untersuchung der Thermostabilität ist dem Kap. 3.7 zu entnehmen.

In Tabelle 4.17 ist die ermittelte Pall-Thermostabilität der drei Substitutionsmutanten nach 10 bzw. 15, 30 und 60 min. vergleichend mit der Referenz aufgeführt.

**Tabelle 4.17 Vergleichende Pall-Thermostabilität der Substitutionsmutanten bei 50 °C**

Stamm	Pall-Thermostabilität [%] <sup>1)</sup>			AS-Substitutionen
	nach 10 min.	nach 30 min.	nach 60 min.	
Referenz	61	7	<1	-
JMSpal203	30 (15 min.)	26	k.A.	N150H, K155Q
JMSpal513	25	8	<1	R310P
JMSpal306	95	≥ 95	≥ 95	N150H, K155Q, G166D, K171R, A173G, E175D

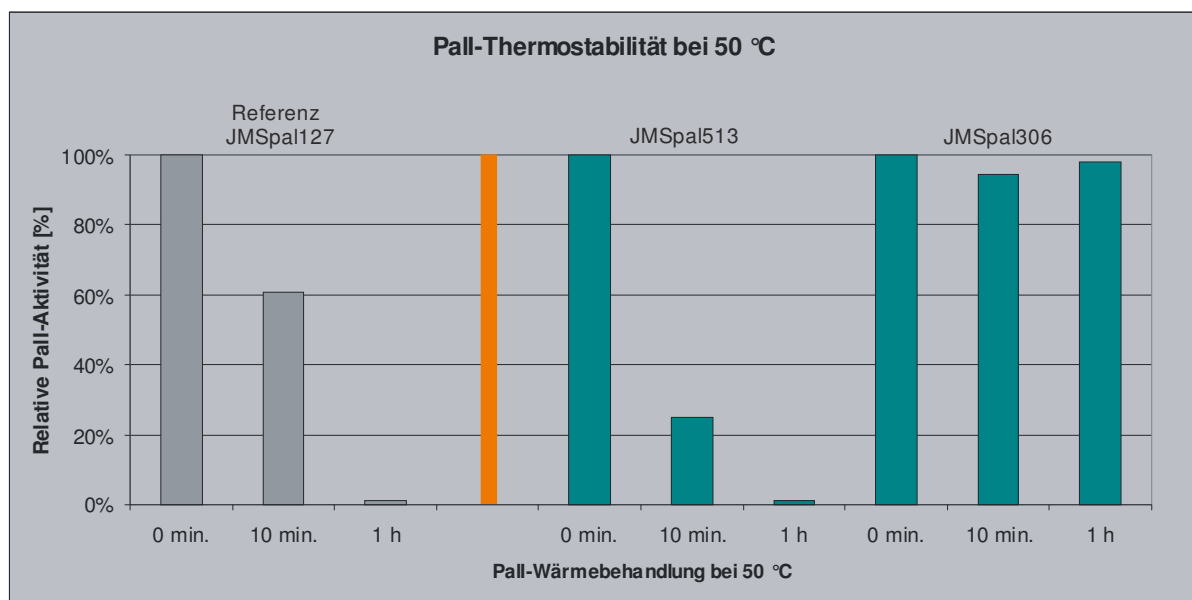
<sup>1)</sup> Pall-Restaktivität nach einer unterschiedlich langen Inkubation bei 50 °C

Die Rest-Aktivität der Pall-haltigen Zellextrakte aus JMSpal203 wurden nach einer Wärmebehandlung von 15 min. und 30 min. gemessen, die der Referenz, aus JMSpal306 und aus JMSpal513 nach einer Inkubationszeit von 10, 30 und 60 min.

Aus Tabelle 4.17 wird deutlich, dass die eingeführten Punktmutationen einen ganz unterschiedlichen Einfluss auf die Thermostabilität des Pall-Enzyms haben.

Nach einer 30-minütigen Wärmebehandlung bei 50 °C ist in den Zellextrakten aus der Referenz und JMSpal513 mit 7 % bzw. 8 % nur noch eine sehr geringe Rest-Aktivität vorhanden. Die Zellextrakte aus der Substitutionsmutante JMSpal203 weisen nach 30 min. noch ca. 26 % ihrer ursprünglichen Pall-Aktivität auf. Ein anderes Bild ergibt sich für die Substitutionsmutante JMSpal306. Nach 30 min. behalten die Zellextrakte nahezu ihre vollständige Pall-Aktivität ( $\geq 95\%$ ).

Die unterschiedlichen Effekte der AS-Substitutionen auf die Thermostabilität der Pall-Enzyme für die Wärmebehandlung bei 10 min. und die Verlängerung dieser Behandlung auf 60 min. zeigt die Abbildung 4-22.



**Abbildung 4-22 Vergleichende Analyse der Pall-Thermostabilität für JMSpal306 und JMSpal513**

Vergleichende Analyse der Pall-Restaktivität nach einer Wärmebehandlung bei 50 °C. Als Referenz dient die Pall-Aktivität der jeweiligen Zellextrakte ohne Wärmebehandlung, diese wird 100 % gesetzt.

Während das Referenz-Enzym nach einer Inkubationsdauer von 10 min. noch 61 % seiner Aktivität besitzt, zeigen die Pall-haltigen Zellextrakte von JMSpal513 nur 25 % der ursprünglichen Aktivität auf. Einer 60-minütige Wärmebehandlung bei 50 °C halten die Zellextrakte aus der Referenz und aus JMSpal513 nicht stand (Restaktivität  $\leq 1\%$ ). Im Vergleich dazu behalten die Zellextrakte aus JMSpal306 nach 60 min. nahezu ihre ursprüngliche Pall-Aktivität. Selbst einer mehrstündigen Wärmebehandlung bei 50 °C hält das Pall-Enzym aus JMSpal306 stand; nach 3 h wurden 95 % der ursprünglichen Pall-Aktivität gemessen.



Die eingeführten Punktmutationen haben einen großen Einfluss auf die Thermostabilität des Pall-Enzyms. Der Austausch einer einzigen AS führt in JMSPal513 zu einem rascheren Aktivitätsverlust bei einer 10-minütigen Wärmebehandlung bei 50 °C. In einigen Publikationen wird erwähnt, dass eine höhere Thermostabilität mit einer erhöhten Menge an Prolin einhergeht (Sriprapundh et al., 2000; Suzuki et al., 1987) und polare AS scheinen in thermophilen Proteinen signifikant weniger vorzuliegen (Sadeghi et al., 2006). Der Austausch von Arg (polar) gegen Pro (unpolar) wirkt sich dennoch negativ auf die Thermostabilität des Enzyms aus. Dieses Ergebnis unterstützt vielmehr die These, dass es keine generelle und einzige Strategie gibt, die Proteine thermostabiler macht. Offensichtlich nutzen die Proteine viele verschiedene Wege, um höheren Temperaturen zu widerstehen (Sadeghi et al., 2006; Wintrode et al., 2001).

Mit der Substitution von 6 AS in JMSPal306 wurde ein extrem thermostabiles Pall-Enzym exprimiert. Dabei kommt der D166, R171, G173, D175-Gruppe eine wichtigere Bedeutung zu als den Punktmutationen H150 und Q155, die in JMSPal203 keine signifikante Veränderung der Thermostabilität bewirkten. Diese Gruppe von vier eng benachbarten Punktmutationen scheint einen signifikanten Einfluss auf die Thermostabilität des Pall-Enzyms auszuüben. Da mit der Substitution K171R und A173G nur zwei der vier Positionen durch AS anderer Eigenschaften ausgetauscht wurden, könnten diese beiden ausgetauschten AS-Positionen ursächlich für die Thermostabilität sein. Welche der vier Positionen oder ob alle gemeinsam für die Erhöhung der Thermostabilität verantwortlich sind, könnte durch eine gezielte Sättigungsmutagenese dieser sechs Aminosäuren untersucht werden. Allerdings wäre dazu Millionen von Mutanten zu untersuchen, was nicht zu realisieren ist; erst recht nicht ohne geeignetes Screening-System.

Wie in Kap. 2.4 bereits erwähnt, scheint die Anpassung von Enzymen an hohe Temperaturen ein Ergebnis des Kompromisses zwischen den Faktoren Starrheit und Flexibilität zu sein (Radestock et al., 2011). Da mit der gewonnenen Thermostabilität die Aktivität des Pall-Enzyms erheblich reduziert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Gruppe der vier AS-Substitutionen die Starrheit des Enzyms auf Kosten der Flexibilität und damit der Enzymfunktion erhöht haben. Die vier AS-Substitutionen in JMSPal306 könnten sich dementsprechend in einer gesteigerten konformationellen Stabilität äußern.

#### 4.3.4 Zusammenfassung: Effekte der AS-Substitutionen auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms

Mit der Einführung von drei AS-Substitutionsgruppen in das Pall-Enzym aus *P. rubrum* entstanden die drei unterschiedlichen Substitutionsmutanten JMSpal203, JMSpal306 und JMSpal513. Die Untersuchungen der drei verschiedenen *P. rubrum*-Mutanten und die Charakterisierung der Pall-Enzyme aus den Zellextrakten zeigen unterschiedliche Effekte der Substitutionen auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms.

Die zwei AS-Substitutionen N150H und K155Q in JMSpal203 wirken sich auf die Aktivität der Pall-haltigen Zellextrakte aus. Beide AS unterscheiden sich u.a. in ihrer Basizität von der ausgetauschten AS und bewirken eine Reduzierung der Expression des mutierten Pall-Enzyms. Es wird deutlich weniger Pall-Enzym exprimiert. Diese verminderte Pall-Menge gibt einen Hinweis darauf, dass die verminderte Expressionsrate und/oder die Bildung instabiler Pall-Moleküle für die niedrigeren Pall-Aktivitäten in den Zellextrakten von JMSpal203 verantwortlich sind.

Die beiden AS-Substitutionen wirken sich nicht auf das Produktspektrum und damit auf die Selektivität des Pall-Enzyms aus. Sowohl die maximale Palatinose-Ausbeute erreicht mit 87,6 % einen nahezu identischen Referenz-Wert, als auch die Nebenprodukte Trehalulose, Glucose und Fructose werden ohne signifikante Veränderung gebildet.

Substitutionen von sechs AS in JMSpal306 haben einen großen Einfluss auf die Pall-Aktivität der Zellextrakte. Verglichen mit der Referenz erreichen die Pall-haltigen Zellextrakte nur noch 25 % der Aktivität. Die Ursache dafür liegt sowohl in einer reduzierten Expression der Pall-Enzyme als auch in der Reduzierung der spezifischen Pall-Aktivität. Somit werden offensichtlich sowohl instabile als auch inaktive Pall-Moleküle exprimiert. Da zwei der sechs AS-Substitution mit den Substitutionen aus JMSpal203 identisch sind und sich die Reduzierung der Aktivität in den Zellextrakten verstärkt hat, scheint besonders die D166, R171, G173, D175-Gruppe für veränderte Eigenschaften des Pall-Enzyms verantwortlich zu sein.

Die sechs AS-Substitutionen wirken sich nicht auf die Pall-Selektivität aus. Das Produktspektrum entspricht dem der Referenz. Weder die max. Palatinose-Ausbeute noch die Nebenprodukte verändern sich. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Positionen der zwei AS-Substitutionen N150H und K155Q sowie die der vier zusätzlichen G166D, K171R, A173G und E175D keine bedeutende Rolle in der Produktbildung spielen.

Mit dem Austausch der sechs Aminosäuren N150H, K155Q, G166D, K171R, A173G und E175D gelang es, eine thermostabile Isomaltulose-Synthase zu produzieren. Das

thermostabile Pall-Enzym hält auch einer mehrstündigen Wärmebehandlung bei 50 °C stand.

Die gewonnene Thermostabilität ist an einen hohen Verlust der Aktivität gekoppelt, welche mit einer strukturellen Änderung des Pall-Enzyms begründet werden könnte. Vermutlich bewirkten die AS-Substitutionen eine erhöhte Starrheit des Enzyms, benötigt für die Thermostabilität, wodurch die konformative Flexibilität, benötigt für eine hohe Aktivität, verringert wurde.

Die Untersuchungen zur Charakterisierung des Pall-Enzyms aus JMSpal513 zeigen, dass bereits eine einzige Substitution einen großen Einfluss auf die Eigenschaft des Pall-Enzyms hat.

Mit dem Austausch der AS R310P im Pall-Enzym reduziert sich die Aktivität der Zellextrakte. Dieser Verlust kann nicht nur mit einer reduzierten Enzymmenge erklärt werden. Vielmehr liegt eine Schwächung der spezifischen Aktivität vor, da die Aktivität des Enzyms nicht mit seiner exprimierten Menge korreliert. Die Einführung von Pro an der Position 310 wird sich vermutlich entscheidend auf die Struktur des Pall-Enzyms auswirken. Sowohl ein Verlust der Thermostabilität als auch eine Veränderung im Produktspektrum verdeutlichen dies. Mit 87,4 % wird eine vergleichbare maximale Palatinose-Ausbeute erzielt, allerdings reduziert sich die Menge an Trehalulose und die Monosacchride (vor allem Fructose) nehmen zu. Da auch die Thermostabilität deutlich gesenkt wurde, ist ein Verlust der konformationellen Stabilität denkbar. Diese Konformationsänderung des gefalteten Pall-Enzyms könnte sich dementsprechend auch auf den Reaktionsmechanismus bzw. auf die Hydrolaseaktivität auswirken.

Die wichtigsten Effekte der AS-Substitutionen auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms werden in folgender Auflistung noch einmal zusammengefasst:

**Tabelle 4.18 Zusammenfassende Darstellung der Effekte der AS-Substitutionen auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms**

<b>Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>	<b>JMSpal203</b>	<b>JMSpal306</b>	<b>JMSpal513</b>
AS-Substitution(en)	-	N150H, K155Q	N150H, K155Q, G166D, K171R, A173G, E175D	R310P
Pall-Aktivität [%]	100,0	<b>45,0</b>	<b>22,0</b>	<b>64,0</b>
Plasmid-Menge [%]	100,0	100,0	100,0	100,0
Pall-Menge [%]	100,0	<b>70,0</b>	<b>58,0</b>	<b>88,0</b>
max. Palatinose-Ausbeut [%]	87,4	87,6	87,3	87,4
Monosaccharide [%]	4,9	4,8	5,0	<b>5,9</b>
Trehalulose [%]	7,5	6,9	7,0	<b>6,0</b>
Pall-Thermostabilität [%] nach 10 min. bei 50 °C	61,0	30,0	<b>95,0</b>	25,0

## 5 Zusammenfassung

Palatinose™, ein Isomer der Saccharose, wird aufgrund seiner ernährungsphysiologischen Eigenschaften im industriellen Maßstab hergestellt und kann auch als regenerativer Ausgangsstoff für die chemische Industrie eingesetzt werden. Palatinose wird durch die enzymatische Konversion aus Saccharose gewonnen. Eine kleine Gruppe von Palatinose-bildenden Bakterien besitzt das Enzym Isomaltulose-Synthase (Pall-Enzym), das für die Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose verantwortlich ist. Bei dieser Reaktion entsteht neben Palatinose ein ganzes Spektrum an unerwünschten Nebenprodukten, deren Verhältnis nicht nur von Organismus zu Organismus, sondern auch in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen variiert. Der industrielle Prozess zur Herstellung von Palatinose ist weitestgehend optimiert, dennoch verteuern die Mengen der Nebenprodukte den Herstellungsprozess.

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Eigenschaften des rekombinanten Pall-Enzyms aus *P. rubrum* durch Verwendung von Mutanten aus einem semirationalen Enzymdesign. Im Zuge des semirationalen Enzymdesigns konnten Zusammenhänge zwischen der Struktur und der Eigenschaft des Pall-Enzyms aus *P. rubrum* hergestellt werden. Hierbei wurde deutlich, dass vor allem ein Vergleich der Pall-Sequenzen aus eng verwandten Organismen eine Möglichkeit bietet, Positionen im *pall*-Gen zu finden, an denen sich eine Veränderung auf molekulargenetischer Ebene höchstwahrscheinlich auch auf die Eigenschaft des Pall-Enzyms auswirkt. Mit dem Austausch von sechs Aminosäuren gelang es uns, dem rekombinanten Pall-Enzym aus *P. rubrum* eine Thermostabilität über mehrere Stunden bei 50 °C zu verleihen. Diese neu gewonnene Enzym-Thermostabilität ist gleichzeitig mit einer drastischen Reduktion der spezifischen Aktivität des mutierten Pall-Enzyms verbunden.

Die Substitution einer einzigen Aminosäure in einem nicht-konservierten Bereich des rekombinanten Pall-Enzyms aus *P. rubrum* veränderte die Enzym-Aktivität, -Selektivität und -Thermostabilität. Somit konnte gezeigt werden, dass Mutationen auch ausserhalb der bereits bekannten konservierten Enzymregionen, wie dem Isomerisierungsmotif, Effekte auf die Enzym-Selektivität ausüben.

Es bestätigt sich auch die Komplexität, mit der Enzyme hohen Temperaturen widerstehen. Gleichzeitig wurde deutlich, dass die Voraussage von Effekten, die eine Mutation in einem bestimmten Enzym aus einem Organismus bewirkt, nicht verallgemeinert werden darf; auch dann nicht, wenn es sich um homologe Enzyme und eng verwandte Organismen handelt. Vielmehr müssen die Wechselwirkungen der betroffenen Aminosäure mit anderen Aminosäuren und die Ausbildung von veränderten Strukturelementen in den Fokus der Betrachtung rücken.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten gentechnischen Manipulationen im Bereich der Fusionsstelle am Anfang des rekombinanten Pall-Moleküls wirken sich auf die Eigenschaften des Pall-Enzyms aus. Besonders die Deletion der drei AS Phe<sub>37</sub>Ile<sub>38</sub>Glu<sub>39</sub> scheint die heterologe Expression des rekombinanten Pall-Enzyms negativ zu beeinflussen. Mit ihr geht die verschlechterte Aktivität des Enzyms einher. Wird dagegen nur die AS Ile<sub>38</sub> entfernt, zeigen sich keine Auswirkungen auf die Expression und die Aktivität. Keine der untersuchten Deletionen jedoch beeinflusst die Selektivität des Pall-Enzyms.

Aus den Untersuchungen zur Thermostabilität des rekombinanten Pall-Enzyms ergibt sich, dass die beiden AS Ile<sub>38</sub> und Glu<sub>39</sub> eine entscheidende Rolle für die thermische Stabilität des Pall-Enzyms spielen. Mit ihrer Deletion verkürzt sich die Thermostabilität bei 50 °C auf unter 10 min. Damit wird bestätigt, dass auch Mutationen weit entfernt vom aktiven Zentrum einen Einfluss auf die Thermostabilität von Enzymen besitzen und eventuell zu strukturellen Änderungen führen.

Als semirationales Enzymdesign stellt die komparative Methode mit Sequenz-Alignment homologer Isomaltulose-Synthasen eine geeignete Methode dar, um Zusammenhänge zwischen Struktur und Eigenschaften des Pall-Enzyms zu untersuchen und Enzymeigenschaften nachhaltig zu verbessern.

Mit dem Austausch der sechs Aminosäuren N150H, K155Q, G166D, K171R, A173G und E175D gelang es uns, eine thermostabile Isomaltulose-Synthase zu produzieren. Dieses neu entwickelte thermostabile Pall-Enzym aus der Mutante JMSpal306 behält auch nach einer mehrstündigen Wärmebehandlung bei 50 °C über 95 % der ursprünglichen Pall-Aktivität bei. Mit der Substitution dieser sechs Aminosäuren ging allerdings nicht nur eine Steigerung der Thermostabilität des Pall-Enzyms einher, sondern auch ein großer Verlust seiner spezifischen Aktivität (~ 50 %). Erklärt werden könnte diese Beobachtung durch den bestehenden Konflikt zwischen hoher Stabilität für die Thermostabilität und der vermutlich eingebüßten konformativen Flexibilität, die für die Aktivität des Enzyms gebraucht wird. Ob und wie sich die Aminosäure-Substitutionen auf die Konformation und damit auf die Struktur des Pall-Enzyms ausgewirkt haben, könnte z.B. mit Hilfe von Kristallstruktur-Analyse näher beleuchtet werden. Ein Vergleich der rekombinanten Substitutionsmutanten JMSpal203 und JMSpal306 lässt vermuten, dass die größten Veränderungen der Enzymeigenschaften auf die D<sub>166</sub>R<sub>171</sub>G<sub>173</sub>D<sub>175</sub>-Gruppe zurückzuführen ist.

Die Substitution der einzelnen Aminosäure Arginin gegen Prolin an der Position 310 in dem rekombinanten Pall-Enzym führte zu einer Veränderung des Produktspektrums, ohne die

maximale Palatinose-Menge zu verändern. Gleichzeitig ging mit dieser Punktmutation die Thermostabilität verloren. Wird für diese thermolabile *P. rubrum*-Mutante die Reaktionstemperatur auf 18 °C gesenkt, erhöht sich die Pall-Selektivität signifikant zu Gunsten der gebildeten Palatinose und gleichzeitig werden weniger Monosaccharide gebildet.

Ein Vergleich der eingeführten Mutationen an identischen Positionen in Pall-Enzymen aus unterschiedlichen Organismen zeigt auch, dass sich die Auswirkungen dieser gentechnischen Eingriffe nicht von einem Organismus auf einen anderen übertragen lassen. Obwohl Aminosäure-Substitutionen an den gleichen Positionen in Pall-Enzymen aus *Klebsiella* und *P. rubrum* erfolgten, bewirkten sie unterschiedliche, ja gar gegensätzliche Änderungen in den Eigenschaften des jeweiligen Pall-Enzyms. Damit wird klar, dass die biologische Funktion eines Enzyms weniger von einzelnen Aminosäuren als von der Konformation des gefalteten Enzyms abhängt, und die Effekte einer einzelnen Aminosäuresubstitution im Zusammenhang mit der gesamten Enzymstruktur betrachtet werden müssen.

Die ortsspezifische Mutagenese bietet die Möglichkeit, eine intelligente Mutantenbibliothek zu erzeugen, bei der sich die einzelnen Varianten auch mit einer aufwändigen Screeningmethode durchsuchen lassen. Gleichzeitig wurde deutlich, dass es sich lohnt, auch in nicht konservierten Bereichen des Pall-Enzyms gentechnische Modifikationen vorzunehmen. So lassen sich weitere Bereiche im Enzym finden, die einen Einfluss auf industriell interessante Eigenschaften, wie Aktivität, Selektivität und Thermostabilität ausüben. Mit diesem Wissen kann es gelingen, die Eigenschaften des Pall-Enzyms zu verbessern und damit den industriellen Herstellungsprozess von Palatinose wirtschaftlicher zu gestalten. Das bedeutet aber auch, dass der Einsatz von genetisch veränderten Organismen (GVO) oder Enzymen künftig keine wegzudenkende Methode zur Steigerung der Effizienz der Palatinose-Herstellung ist. Da diese Palatinose nicht in den Geltungsbereich der „Verordnung über genetisch veränderte Lebensmittel“ fallen würde, wäre eine Palatinose-Herstellung mit einem Enzym aus einem genetisch veränderten Organismus ohne GVO-, Zulassungs-, oder Kennzeichnungspflicht möglich.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aharoni A, Griffiths AD, Tawfik DS. (2005) High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 210-216
- Ahn SJ, Yoo JH, Lee HC, Kim JH, Lee JK. (2003) Enhanced conversion of sucrose to isomaltulose by a mutant of *Erwinia rhapontici*. *Biotechnology Letters* 25: 1179-1183
- Akahoshi R, Mizubushi T, Takahashi Y, Saita T. Yoghurt. [EP0809939]. 13-6-2002.
- Aldhous P. (1993) Managing the Genome Data Deluge. *Science* 262: 502-503
- Arnold FH, Volkov AA. (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 54-59
- Aroonnu A, Nihira T, Seki T, Panbangred W. (2007) Role of several key residues in the catalytic activity of sucrose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* NK33-98-8. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1221-1227
- Arrhenius S. (1889) Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Invasion von Rohrzucker durch Säure. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 4: 226-248
- Barak Y, Nov Y, Ackerley DF, Matin A. (2008) Enzyme improvement in the absence of structural knowledge: a novel statistical approach. *ISME Journal* 2: 171-179
- Berry EN. B EN- Nährstoffdrink mit Palatinose. 21-6-2011.
- Bisswanger H. 2000. Enzymkinetik-Theorie und Methoden. Weinheim:WILEY-VCH Verlag.
- Bloom JD, Meyer MM, Meinhold P, Otey CR, MacMillan D, Arnold FH. (2005) Evolving strategies for enzyme engineering. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 447-452
- Boder ET, Wittrup KD. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology* 15: 553-557
- Bohm G. (1996) New approaches in molecular structure prediction. *Biophysical Chemistry* 59: 1-32
- Bolhuis GK, Engelhart JJP, Eissens AC. (2009) Compaction properties of isomalt. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72: 621-625
- Bollinger H. (1987) Palatinit<sup>®</sup> (Isomalt) - ein kalorienreduzierter Zuckeraustauschstoff - Technologische und physikalische Eigenschaften, Teil 1. *Gordian* 87: 92-95
- Bollinger H, Keme T. Manufacture of sugar-free, dietetic and/or tooth-protecting chocolate. Suedzucker, A. G. [DE3739999-A1]. 1990.
- Bommarius AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF, Polizzi KM. (2006) High-throughput screening for enhanced protein stability. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 606-610
- Bornke F, Hajirezaei M, Sonnewald U. (2001) Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. *Journal of Bacteriology* 183: 2425-2430

Brouns FJPH, Simon JGDC. Isomaltulose or trehalose containing comestibles for sustained carbohydrate energy release and increased fat oxidation. Fitch, Even Tabin & Flannery P. O. Box 65973 Washington DC 20035 US. 10/565367[US 20060188627A1]. 2006.

Bruins ME, Janssen AE, Boom RM. (2001) Thermozyymes and their applications: a review of recent literature and patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 90: 155-186

Buchholz K, Seibel J. (2008) Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research* 343: 1966-1979

Cartarius R, Krause T, Vogel H. (2002) Catalyst development for the reductive amination of isomaltulose. *Chemie Ingenieur Technik* 74: 869-875

Cha J, Jung JH, Park SE, Cho MH, Seo DH, Ha SJ, Yoon JW, Lee OH, Kim YC, Park CS. (2009) Molecular cloning and functional characterization of a sucrose isomerase (isomaltulose synthase) gene from *Enterobacter* sp FMB-1. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1119-1130

Cheetham PSJ, Imber CE, Isherwood J. (1982) The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. *Nature* 299: 628-631

Chen J, Lu Z, Sakon J, Stites WE. (2000) Increasing the thermostability of staphylococcal nuclease: implications for the origin of protein thermostability. *Journal of Molecular Biology* 303: 125-130

Cho MH, Park SE, Lim JK, Kim JS, Kim JH, Kwon DY, Park CS. (2007) Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. *Biotechnology Letters* 29: 453-458

Choi JH, Lee SY. (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 625-635

Creighton TE. (1988) Disulphide bonds and protein stability. *BioEssays* 8: 57-63

Dahiyat BI, Mayo SL. (1996) Protein design automation. *Protein Science* 5: 895-903

Damborsky J, Brezovsky J. (2009) Computational tools for designing and engineering biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 13: 26-34

Dandekar T, Argos P. (1992) Potential of Genetic Algorithms in Protein Folding and Protein Engineering Simulations. *Protein Engineering* 5: 637-645

Daugherty PS, Chen G, Olsen MJ, Iverson BL, Georgiou G. (1998) Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Engineering* 11: 825-832

Daugherty PS, Iverson BL, Georgiou G. (2000) Flow cytometric screening of cell-based libraries. *Journal of Immunological Methods* 243: 211-227

Davies G, Henrissat B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859

de Oliva-Neto P, Menao PT. (2009) Isomaltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate. *Bioresource Technology* 100: 4252-4256

Dean D. (1981) A Plasmid Cloning Vector for the Direct Selection of Strains Carrying Recombinant Plasmids. *Gene* 15: 99-102



- Desai N. (1990) Esters of sucrose and glucose as cosmetic materials. As renewable natural resources, carbohydrates are gaining importance as chemical raw materials. *Cosmetics & Toiletries* 105:
- Dörr T, Evers H, Guderjahn LDr, Kowalczyk JDr, Nielebock J-K. Alkoholarme Biere oder bierähnliche Erfrischungsgetränke mit Palatinose. [DE10362026A1]. 21-7-2005.
- Drepper T, Eggert T, Hummel W, Leggewie C, Pohl M, Rosenau F, Jaeger KE. (2006) New biocatalysts for White Biotechnology. *Chemie Ingenieur Technik* 78: 239-248
- Eccles JR, Saldanha JW. (1990) Metadata-Based Generation and Management of Knowledge-Bases from Molecular Biological Databases. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 32: 115-123
- Eggleston G. 2008. Sucrose and related oligosaccharides. In: Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J, editors. *Glycoscience*. Springer Berlin Heidelberg. p. 1163-1183.
- Eijsink VGH, Bjork A, Gaseidnes S, Sirevag R, Synstad B, van den Burg B, Vriend G. (2004) Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology* 113: 105-120
- Frauenfelder H, Parak F, Young RD. 1988. Conformational Substates in Proteins. In: Engelman DM, editor. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. California, USA: Annual reviews inc. p. 457-479.
- Gates CM, Stemmer WPC, Kaptein R, Schatz PJ. (1996) Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor "headpiece dimer". *Journal of Molecular Biology* 255: 373-386
- Gau W, Kurz J, Muller L, Fischer E, Steinle G, Grupp U, Siebert G. (1979) Analytische Charakterisierung von Palatinin. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* 168: 125-130
- Godshall M. (2007) The expanding world of nutritive and non-nutritive sweeteners. *Sugar Journal* 69: 12-20
- Gouffi K, Pica N, Pichereau V, Blanco C. (1999) Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1491-1500
- Gryczan TJ, Dubnau D. (1982) Direct Selection of Recombinant Plasmids in *Bacillus-Subtilis*. *Gene* 20: 459-469
- Hamada S. (2002) Role of sweeteners in the etiology and prevention of dental caries. *Pure and Applied Chemistry* 74: 1293-1300
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. (1991) Plasmid Transformation of *Escherichia-Coli* and Other Bacteria. *Methods in Enzymology* 204: 63-113
- Hanes J, Pluckthun A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 4937-4942
- Hao JJ, Berry A. (2004) A thermostable variant of fructose bisphosphate aldolase constructed by directed evolution also shows increased stability in organic solvents. *Protein Engineering Design & Selection* 17: 689-697

- Heinz FPD<sub>r</sub>3HD, Hertel S3LD, Kunz MDr6WD, Vogel MDr6ND. Disaccharidderivate zur Behandlung von Hyperglykämien. [DE19748195A1 06.05.1999]. 6-5-1999.
- Hellings HW, Richards FM. (1991) Construction of New Ligand-Binding Sites in Proteins of Known Structure .1. Computer-Aided Modeling of Sites with Predefined Geometry. *Journal of Molecular Biology* 222: 763-785
- Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G, Galas DJ. (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 17: 6545-6551
- Henrissat B, Davies G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 7: 637-644
- Hocker B. (2008) Proteindesign und -engineering. *Nachrichten aus der Chemie* 56: 298-301
- Hockney RC. (1994) Recent Developments in Heterologous Protein-Production in *Escherichia-Coli*. *Trends in Biotechnology* 12: 456-463
- Holub I, Gostner A, Theis S, Nosek L, Kudlich T, Melcher R, Scheppach W. (2010) Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose (Palatinose). *British Journal of Nutrition* 103: 1730-1737
- Huang JH, Hsu LH, Su YC. (1998) Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 21: 22-27
- Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Stahl S. (2002) Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology Applied Biochemistry* 35: 91-105
- Kashimura J, Nagai Y, Ebashi T. Agent for suppressing glucose level increase, agent for suppressing body fat accumulation and food compound. Mitsui, Sugar. [US20110008486-A1]. 2003.
- Kawaguti HY, Celestino EM, Moraes ALL, Yim DK, Yamamoto LK, Sato HH. (2010) Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. *Biochemical Engineering Journal* 48: 211-217
- Kawaguti HY, Sato HH. (2007) Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. *Biochemical Engineering Journal* 36: 202-208
- Kawai K, Okuda Y, Yamashita K. (1985) Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinologia Japonica* 32: 933-936
- Kneller BW. Palatinose for enhancing Dietary supplement and pharmaceutical delivery. US. US/12/504480. 2009.
- Koch I, Kaden F, Selbig J. (1992) Analysis of Protein Sheet Topologies by Graph Theoretical Methods. *Proteins-Structure Function and Genetics* 12: 314-323
- Koh IYY, Eyrich VA, Marti-Renom MA, Przybylski D, Madhusudhan MS, Eswar N, Grana O, Pazos F, Valencia A, Sali A, Rost B. (2003) EVA: evaluation of protein structure prediction servers. *Nucleic Acids Research* 31: 3311-3315
- Kourist R, Hohne M, Bornscheuer UT. (2009) Directed evolution and rational design. *Chemie in Unserer Zeit* 43: 132-142

- Krastanov A, Blazheva D, Stanchev V. (2007) Sucrose conversion into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells in a hollow-fibre bioreactor. *Process Biochemistry* 42: 1655-1659
- Krastanov A, Blazheva D, Yoshida T. (2006) Conversion of sucrose into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 12: 721-726
- Krastanov A, Yoshida T. (2003) Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30: 593-598
- Kunz DrM, Guderjahn L, Schüttenhelm M, Kowalczyk DrJ. N-alkylisomaltamines, their preparation from isomaltulose and their application as surfactants. Südzucker AG and DE. EP19940104472[EP0618216B1]. 1997.
- Kunz M, Puke H, Recker C. (1995) Catalytic-Oxidation of Isomaltulose. *Chemie Ingenieur Technik* 67: 836-842
- Kunz M, Dörr T, Fritzsching B, Klingeberg M, Kozianowski G, Rapp KM, Kowalczyk J, Sträter PJ. Therapeutic anti-cold agent containing isomalt as an active ingredient. CA19992330563. 4-11-1999.
- Kutzbach C, Schmidt-Kastner G, Schutt H. Saccharose-Mutase, immobilisierte Saccharose-Mutase und Verwendung von dieser immobilisierten Saccharose-Mutase zur Herstellung von Isomaltulose (6-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosido-D-fructose). Bayer AG. [DE 30 38 218 A1]. 6-5-1982.
- Lamla T, Erdmann VA. (2001) In vitro selection of other proteins than antibodies by means of ribosome display. *Febs Letters* 502: 35-40
- Lee G-Y, Jung JH, Seo DH, Hansin J, Ha SJ, Cha J, Kim Y-S, Park CS. (2011) Isomaltulose production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter* sp. FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 102: 9179-9184
- Lee HC, Kim JH, Kim SY, Lee JK. (2008) Isomaltulose production by modification of the fructose-binding site on the basis of the predicted structure of sucrose isomerase from "*Protaminobacter rubrum*". *Applied Environmental Microbiology* 74: 5183-5194
- Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen L. (2009) Directed Evolution of Enzymes: Library Screening Strategies. *Iubmb Life* 61: 222-228
- Leemhuis H, Stein V, Griffiths AD, Hollfelder F. (2005) New genotype-phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 472-478
- Lehmann M, Wyss M. (2001) Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 371-375
- Lehner A, Riedel K, Rattei T, Ruepp A, Frishman D, Breeuwer P, Diep B, Eberl L, Stephan R. (2006) Molecular characterization of the alpha-glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 609-625
- Li S, Cai H, Qing YJ, Ren B, Xu H, Zhu HY, Yao J. (2011) Cloning and Characterization of a Sucrose Isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5 for Isomaltulose Hyperproduction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 163: 52-63

- Li XZ, Zhang DH, Chen F, Ma J, Dong YH, Zhang LH. (2004) *Klebsiella singaporensis* sp nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2131-2136
- Lichtenthaler FW, Brust A, Cuny E. (2001) Sugar-derived building blocks. Part 26. Hydrophilic pyrroles, pyridazines and diazepinones from D-fructose and isomaltulose. *Green Chemistry* 3: 201-209
- Lina BA, Jonker D, Kozianowski G. (2002) Isomaltulose (Palatinose): a review of biological and toxicological studies. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1375-1381
- Lipski A, Rhimi M, Haser R, Aghajari N. (2010) Structure/Function Relationships of sucrose Isomerases with Different Product Specificity. *Journal of Applied Glycoscience* 57: 219-228
- Low NH, Sporns P. (1988) Analysis and Quantitation of Minor Disaccharides and Trisaccharides in Honey, Using Capillary Gas-Chromatography. *Journal of Food Science* 53: 558-561
- Marienhagen J, Schwaneberg U, Helm M. (2009) *Biochemistry and molecular biology 2008*. *Nachrichten aus der Chemie* 57: 278-286
- Martä N, Funes LL, Saura D, Micol V. (2008) An update on alternative sweeteners. *Agro Food Industry Hi-Tech* 19: 8-10
- Matsukubo T, Takazoe I. (2006) Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *International Dental Journal* 56: 119-130
- Matsumura M, Becktel WJ, Levitt M, Matthews BW. (1989) Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89: 6562-6566
- McAllister M, Kelly CT, Doyle E, Fogarty WM. (1990) The Isomaltulose Synthesizing Enzyme of *Serratia-Plymuthica*. *Biotechnology Letters* 12: 667-672
- Merz A, Yee MC, Szadkowski H, Pappenberger G, Crameri A, Stemmer WC, Yanofsky C, Kirschner K. (2000) Improving the Catalytic Activity of a Thermophilic Enzyme at Low Temperatures. *Biochemistry* 39: 880-889
- Minami T, Fujiwara T, Ooshima T, Nakajima Y, Hamada S. (1990) Interaction of Structural Isomers of Sucrose in the Reaction Between Sucrose and Glucosyltransferases from Mutans *Streptococci*. *Oral Microbiology and Immunology* 5: 189-194
- Miyata Y, Sugitani T, Tsuyuki K, Ebashi T, Nakajima Y. (1992) Isolation and Characterization of *Pseudomonas-Mesoacidophila* Producing Trehalulose. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 1680-1681
- Morley KL, Kazlauskas RJ. (2005) Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology* 23: 231-237
- Mortensen A. (2006) Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. *Scandinavian Journal of Food & Nutrition* 50:
- Munir M. Verfahren zur Herstellung von Isomaltulose (6-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosido-D-fructose) mit Hilfe von immobilisierten Bakterienzellen. Südzucker AG. [DE 32 13 107 A1]. 13-10-1983.

- Nagai Y, Sugitani T, Tsuyuki K. (1994) Characterization of alpha-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 58: 1789-1793
- Nagaimiyata Y, Tsuyuki K, Sugitani T, Ebashi T, Nakajima Y. (1993) Isolation and Characterization of A Trehalulose-Producing Strain of *Agrobacterium*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57: 2049-2053
- Nakajima Y, Yamato K, Nishio K, Kashiwa C, Mizutani T, Yokohama K, Ogasa K, Kamakura K, Kashimura J. Palatinose-Kondensationsprodukt, Verfahren zu dessen Herstellung und dessen Verwendung zur Proliferation von Bifidobakterium. Mitsui Sugar Co. [DE 38 18 884 A1]. 5-1-1989.
- Nollborchers M, Kunz M. (1994) From 3'-Keto-Isomaltulose to Polymers. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 13: 1215-1223
- Olsen MJ, Stephens D, Griffiths D, Daugherty P, Georgiou G, Iverson BL. (2000) Function-based isolation of novel enzymes from a large library. *Nature Biotechnology* 18: 1071-1074
- Ooshima T, Izumitani A, Sobue S, Okahashi N, Hamada S. (1983) Non-Cariogenicity of the Disaccharide Palatinose in Experimental Dental-Caries of Rats. *Infection and Immunity* 39: 43-49
- Oschkinat H, Muller T, Dieckmann T. (1994) Protein-Structure Determination with 3-Dimensional and 4-Dimensional Nmr-Spectroscopy. *Angewandte Chemie-International Edition* 33: 277-293
- Park SE, Cho MH, Lim JK, Kim JS, Kim JH, Kwon DY, Park CS. (2007) A new colorimetric method for determining the isomerization activity of sucrose isomerase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 71: 583-586
- Parpot P, Muiuane VP, Defontaine V, Bettencourt AP. (2010) Electrocatalytic oxidation of readily available disaccharides in alkaline medium at gold electrode. *Electrochimica Acta* 55: 3157-3163
- Perl D, Mueller U, Heinemann U, Schmid FX. (2000) Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nature Structural Biology* 7: 380-383
- Petrek M, Otyepka M, Banas P, Kosinova P, Koca J, Damborsky J. (2006) CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *Bmc Bioinformatics* 7:
- Radestock S, Gohlke H. (2011) Protein rigidity and thermophilic adaptation. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 79: 1089-1108
- Ravaud S, Robert X, Watzlawick H, Haser R, Mattes R, Aghajari N. (2007) Trehalulose synthase native and carbohydrate complexed structures provide insights into sucrose isomerization. *Journal of Biological Chemistry* 282: 28126-28136
- Ravaud S, Robert X, Watzlawick H, Haser R, Mattes R, Aghajari N. (2009) Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases. *FEBS Letters* 583: 1964-1968
- Ravaud S, Robert X, Watzlawick H, Laurent S, Haser R, Mattes R, Aghajari N. (2008) Insights into sucrose isomerization from crystal structures of the *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 sucrose isomerase, MutB. *Biocatalysis and Biotransformation* 26: 111-119

- Ravaud S, Watzlawick H, Haser R, Mattes R, Aghajari N. (2005a) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the trehalulose synthase MutB from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 61: 100-103
- Ravaud S, Watzlawick H, Haser R, Mattes R, Aghajari N. (2006) Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* sucrose isomerase SmuA. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 62: 74-76
- Ravaud S, Watzlawick H, Mattes R, Haser R, Aghajari N. (2005b) Towards the three-dimensional structure of a sucrose isomerase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Biologia* 60: 89-95
- Reetz MT, Zonta A, Schimossek K, Liebeton K, Jaeger KE. (1997) Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution. *Angewandte Chemie-International Edition* 36: 2830-2832
- Roberts RW, Szostak JW. (1997) RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 12297-12302
- Rose T, Kunz M. (2002) Production of Isomalt. *Landbauforschung Völkenrode Sonderheft* 241: 75-80
- Sadeghi M, Naderi-Manesh H, Zarrabi M, Ranjbar B. (2006) Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry* 119: 256-270
- Sailen Barik. 1995. Site-directed Mutagenesis by PCR: Substitution, Insertion, Deletion, and Gene Fusion. In: Gobinda Sarkar, editor. *PCR in Neuroscience*. Academic Press, inc. p. 309-323.
- Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal* 9: 69-80
- Salvucci ME. (2003) Distinct sucrose isomerases catalyze trehalulose synthesis in whiteflies, *Bemisia argentifolii*, and *Erwinia rhapontici*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemical and Molecular Biology* 135: 385-395
- Saska Z, Dredan J, Balogh E, Luhn O, Shafir G, Antal I. (2010) Effect of isomalt as novel binding agent on compressibility of poorly compactable paracetamol evaluated by factorial design. *Powder Technology* 201: 123-129
- Schiweck H. (1979) Palatinit® - technological properties. *Health and Sugar Substitutes Proc ERGOB Conf*, Geneva 1978, (Karger, Basel 1978)138-144
- Schiweck H. (1980) Palatinit® - Herstellung, technologische Eigenschaften und Analytik palatinithaltiger Lebensmittel. *Alimenta* 19: 5-16
- Schiweck H, Munir M, Rapp KM, Schneider B, Vogel M. (1990) New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. *Zuckerindustrie* 115: 555-565
- Schmidt FR. (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 363-372
- Seelig B, Szostak JW. (2007) Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold. *Nature* 448: 828-U13

- Shimizu J, Suzuki K, Nakajima Y. Method of producing an immobilized  $\alpha$ -glucosyl transferase useful in the production of palatinose from sucrose. Mitsui Sugar Co. [GB 2 082 591 A]. 10-3-1982.
- Smith GP. (1985) Filamentous Fusion Phage - Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* 228: 1315-1317
- Smith GP, Petrenko VA. (1997) Phage display. *Chemical Reviews* 97: 391-410
- Sorensen HP, Mortensen KK. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115: 113-128
- Sriprapundh D, Vieille C, Zeikus JG. (2000) Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by site-directed mutagenesis. *Protein Engineering* 13: 259-265
- Sterner R, Kleemann GR, Szadkowski H, Lustig A, Hennig M, Kirschner K. (1996) Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Science* 5: 2000-2008
- Suzuki Y, Oishi K, Nakano H, Nagayama T. (1987) A Strong Correlation Between the Increase in Number of Proline Residues and the Rise in Thermostability of 5 *Bacillus Oligo-1,6-Glucosidases*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 546-551
- Takazoe I. 1989. Palatinose - an isomeric alternative to sucrose. In: Grenby TH, editor. *Progress in Sweeteners*. Elsevier, London. p. 143-167.
- Tawfik DS, Griffiths AD. (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology* 16: 652-656
- Taylor SV, Kast P, Hilvert D. (2001) Investigating and engineering enzymes by genetic selection. *Angewandte Chemie-International Edition* 40: 3310-3335
- Terpe K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 211-222
- Trombotto S, Bouchu A, Descotes G, Queneau Y. (2000) Hydrogen peroxide oxidation of palatinose and trehalulose: direct preparation of carboxymethyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside. *Tetrahedron Letters* 41: 8273-8277
- Turner NJ. (2003) Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends in Biotechnology* 21: 474-478
- Uitdehaag JCM, Mosi R, Kalk KH, van der Veen BA, Dijkhuizen L, Withers SG, Dijkstra BW. (1999) X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family. *Nature Structural Biology* 6: 432-436
- Varadarajan N, Rodriguez S, Hwang BY, Georgiou G, Iverson BL. (2008) Highly active and selective endopeptidases with programmed substrate specificities. *Nature Chemical Biology* 4: 290-294
- Veronese T, Perlot P. (1999) Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 263-269
- Veronese T, Perlot P. (1998) Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. *FEBS Letters* 441: 348-352

- Vieille C, Burdette DS, Zeikus JG. (1996) Thermozyymes. *Biotechnology Annual Review* 2: 1-83
- Watzlawick H, Mattes R. (2009) Gene cloning, protein characterization, and alteration of product selectivity for the trehalulose hydrolase and trehalulose synthase from "Pseudomonas mesoacidophila" MX-45. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7026-7036
- Weidenhagen R, Lorenz S. (1957a) Ein Neues Bakteriellles Umwandlungsprodukt der Saccharose. *Angewandte Chemie-International Edition* 69: 641
- Weidenhagen R, Lorenz S. Verfahren zur Herstellung von Palatinose (6-a-Glucosido-fructofuranose). Südzucker AG. [DE 1 049 800 A]. 11-10-1957b.
- West DJ, Morton RD, Stephens JW, Bain SC, Kilduff LP, Luzio S, Still R, Bracken RM. (2011) Isomaltulose Improves Postexercise Glycemia by Reducing CHO Oxidation in T1DM. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 43: 204-210
- Wintrode P, Arnold F. 2001. Temperature adaptation of enzymes: Lessons from laboratory evolution. In: *ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY*. USA: Academic Press Inc. p. 161-225.
- Wolfson HJ, Shatsky M, Schneidman-Duhovny D, Dror O, Shulman-Peleg A, Ma BY, Nussinov R. (2005) From structure to function: Methods and applications. *Current Protein & Peptide Science* 6: 171-183
- Wu L, Birch RG. (2004) Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology* 97: 93-103
- Wu L, Birch RG. (2005) Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1581-1590
- Yatka RJ, Richey LC. Chewing gum coated with palatinose or palatinose oligosaccharide. Wm.Wrigley Jr.Company. [US5298263]. 1994.
- Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. (2007) Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology* 127: 335-347
- Yosef E, Politi R, Choi MH, Shifman JM. (2009) Computational Design of Calmodulin Mutants with up to 900-Fold Increase in Binding Specificity. *Journal of Molecular Biology* 385: 1470-1480
- You L, Arnold FH. (1996) Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Engineering* 9: 77-83
- Zanghellini A, Jiang L, Wollacott AM, Cheng G, Meiler J, Althoff EA, Rothlisberger D, Baker D. (2006) New algorithms and an in silico benchmark for computational enzyme design. *Protein Science* 15: 2785-2794
- Zeikus JG, Vieille C, Savchenko A. (1998) Thermozyymes: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles* 2: 179-183
- Zhang D, Li N, Lok SM, Zhang LH, Swaminathan K. (2003a) Isomaltulose synthase (Pall) of *Klebsiella* sp. LX3. Crystal structure and implication of mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 278: 35428-35434



- Zhang D, Li N, Swaminathan K, Zhang LH. (2003b) A motif rich in charged residues determines product specificity in isomaltulose synthase. *FEBS Letters* 534: 151-155
- Zhang D, Li X, Zhang LH. (2002) Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: gene cloning and characterization and engineering of thermostability. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2676-2682
- Zhang JH, Dawes G, Stemmer WPC. (1997) Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 4504-4509
- Zhao HM, Giver L, Shao ZX, Affholter JA, Arnold FH. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology* 16: 258-261
- Zhou XX, Wang YB, Pan YJ, Li WF. (2008) Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids* 34: 25-33
- Zocher F, Trauthwein H, Riermeier TH, Dingerdissen U. (2001) New directions in biocatalysis. *Chemie in Unserer Zeit* 35: 238-249

## 8 Anhang

vollständige Nukleotidsequenz des *pall*-Gens aus JMSpal203:

```

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTTCATCGAA CAGTCGAAAA CCATACCTAA
ATGGTGGAAG GAGGCTGTTT TTTATCAGGT GTATCCGCGC TCCTTTAAAG
ACACCAACGG AGATGGCATC GGGGATATTA ACGGCATCAT AGAAAAATTA
GACTATCTAA AAGCCTTGGG GATTGATGCC ATTTGGATCA ACCCACATTA
TGATTCTCCG AACACGGATA ATGGTTACGA TATACGTGAT TATCGAAAAA
TCATGAAAGA ATATGGCACG ATGGAGGATT TTGACCGCCT GATTTCTGAA
ATGAAAAAAC GGAATATGCG GTTGATGATT GATGTGGTCA TCAACCACAC
CAGCGATCAA CACGAATGGT TTGTTTACAG TAAAAGCAGT AAGGATAATC
CTTATCGCGG CTATTATTTT TGGAAAGATG CTAAAGAAGG GCAGGCGCCT
AATAATTACC CTTTATTCTT TGGTGGCTCG GCGTGGCAAA AAGATGAAAA
GACCAATCAA TACTACCTGC ACTATTTTGC TAAACAACAG CCTGACCTAA
ACTGGGATAA TCCCAAAGTC CGTCAAGATC TTTATGCAAT GTTACGTTTC
TGGTTAGATA AAGGCGTGTC TGGTTTACGT TTTGATACGG TAGCGACCTA
CTCAAAAATT CCGGATTTCC CAAATCTCAC CCAACAACAG CTGAAGAATT
TTGCAGCGGA GTATACCAAG GGCCCTAATA TTCATCGTTA CGTCAATGAA
ATGAATAAAG AGGTCTTGTC TCATTACGAC ATTGCGACTG CCGGTGAAAT
CTTTGGCGTA CCCTTGGATC AATCGATAAA GTTCTTCGAT CCCCGCCGTG
ATGAGCTGAA CATTGCATTT ACCTTTGACT TAATCAGACT CGATCGAGAC
TCTGATCAAA GATGGCGTCG AAAAGATTGG AAATTGTCGC AATTCCGGCA
GATCATCGAT AACGTTGACC GTACTGCAGG AGAATATGGT TGGAATGCCT
TCTTCTTGGA TAACCACGAC AATCCGCGCG CTGTCTCGCA CTTTGGCGAT
GATCGCCAC AATGGCGTGA GCCATCGGCT AAAGCGCTTG CAACCTTGAC
GCTGACTCAA CGAGCAACAC CTTTTATTTA TCAAGGTTCA GAATTGGGCA
TGACCAATTA CCCGTTTAAA GCTATTGATG AATTCGATGA TATTGAGGTG
AAAGGTTTTT GGCATGACTA CGTTGAGACA GGAAAGGTCA AAGCCGACGA
GTTCTTGCAA AATGTACGCC TGACGAGCAG GGATAACAGC CGGACGCCGT
TCCAATGGGA TGGGAGCAAA AATGCAGGAT TCACGAGCGG AAAACCTTGG
TTCAAGGTCA ACCCAAATA CCAGGGAATC AATGCAGTAA GTCAAGTCAC
ACAACCCGAC TCAGTATTTA ACTATTATCG TCAGTTGATC AAGATAAGGC
ATGACATCCC GGCATGACC TATGGTACAT ACACCGATTT GGATCCTGCA
AATGATTCGG TCTACGCCTA TACACGCAGC CTTGGGGCGG AAAAATATCT
TGTTGTTGTT AACTTCAAGG AGCAAATGAT GAGATATAAA TTACCGGATA
ATTTATCCAT TGAGAAAGTG ATTATAGACA GCAACAGCAA AAACGTGGTG
AAAAAGAATG ATTCATTACT CGAGCTAAAA CCATGGCAGT CAGGAGTTTA
TAAACTAAAT CAATAA*Stop

```

Aminosäuren:

```

MTMITPSFIE QSKTIPKWWK EAVFYQVYPR SFKDTNGDGI GDINGIIEKL
DYLKALGIDA IWINPHYDSP NTDNGYDIRD YRKIMKEYGT MEDFDRLISE
MKKRNMR LMI DVVINHTSDQ HEWFVQSKSS KDNPYRGYYF WKDAKEGQAP
NNYPSFFGGS AWQKDEKTNQ YYLHYFAKQQ PDLNWDNPKV RQDLYAMLRF
WLDKGVSGLR FDTVATYSKI PDFPNLTQQQ LKNFAAEYTK GPNIHRYVNE
MNKEVL SHYD IATAGEIFGV PLDQSIKFFD RRRDELNIAF TFDLIRLDRD
SDQRWRRKDW KLSQFRQIID NVDRTAGEYG WNAFFLDNHD NPRAVSHFGD
DRPQWREPSA KALATLTLTQ RATPFYIQGS ELGMTNYPFK AIDEFDDIEV
KGFWDHYVET GKVKADEFLQ NVRLTSRDNS RTPFQWDGSK NAGFTSGKPW
FKVNP NYQEI NAVSQVTQPD SVFNYYRQLI KIRHDIPALT YGTYTDLDPA

```

NDSVYAYTRS LGAEKYLVVV NFKEQMMRYK LPDNLSIEKV IIDSNSKNVV  
 KKNDLLELK PWQSGVYKLN Q\*Stop

**vollständige Nukleotidsequenz des *pall*-Gens aus JMSpal306:**

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTTCATCGAA CAGTCGAAAA CCATACCTAA  
 ATGGTGGAAAG GAGGCTGTTT TTTATCAGGT GTATCCGCGC TCCTTTAAAG  
 ACACCAACGG AGATGGCATC GGGGATATTA ACGGCATCAT AGAAAAATTA  
 GACTATCTAA AAGCCTTGGG GATTGATGCC ATTTGGATCA ACCCACATTA  
 TGATTCTCCG AACACGGATA ATGGTTACGA TATACGTGAT TATCGAAAAA  
 TCATGAAAGA ATATGGCACG ATGGAGGATT TTGACCGCCT GATTTCTGAA  
 ATGAAAAAAC GGAATATGCG GTTGATGATT GATGTGGTCA TCAACCACAC  
 CAGCGATCAA CACGAATGGT TTGTTCAAG TAAAAGCAGT AAGGATAATC  
 CTTATCGCGA CTATTATTTT TGGCGTGATG GTAAAGATGG GCAGGCGCCT  
 AATAATTACC CTTTATTCTT TGGTGGCTCG GCGTGGCAAA AAGATGAAAA  
 GACCAATCAA TACTACCTGC ACTATTTTGC TAAACAACAG CCTGACCTAA  
 ACTGGGATAA TCCCAAAGTC CGTCAAGATC TTTATGCAAT GTTACGTTTC  
 TGGTTAGATA AAGGCGTGTC TGGTTTACGT TTTGATACGG TAGCGACCTA  
 CTCAAAAATT CCGGATTTCC CAAATCTCAC CCAACAACAG CTGAAGAATT  
 TTGCAGCGGA GTATACCAAG GGCCCTAATA TTCATCGTTA CGTCAATGAA  
 ATGAATAAAG AGGTCTTGTC TCATTACGAC ATTGCGACTG CCGGTGAAAT  
 CTTTGGCGTA CCCTTGGATC AATCGATAAA GTTCTTCGAT CCCCGCCGTG  
 ATGAGCTGAA CATTGCATTT ACCTTTGACT TAATCAGACT CGATCGAGAC  
 TCTGATCAAA GATGGCGTCG AAAAGATTGG AAATTGTCGC AATTCCGGCA  
 GATCATCGAT AACGTTGACC GTACTGCAGG AGAATATGGT TGGAATGCCT  
 TCTTCTTGGA TAACCACGAC AATCCGCGCG CTGTCTCGCA CTTTGGCGAT  
 GATCGCCAC AATGGCGTGA GCCATCGGCT AAAGCGCTTG CAACCTTGAC  
 GCTGACTCAA CGAGCAACAC CTTTTATTTA TCAAGGTTCA GAATTGGGCA  
 TGACCAATTA CCCGTTTAAA GCTATTGATG AATTCGATGA TATTGAGGTG  
 AAAGGTTTTT GGCATGACTA CGTTGAGACA GGAAAGGTCA AAGCCGACGA  
 GTTCTTGCAA AATGTACGCC TGACGAGCAG GGATAACAGC CGGACGCCGT  
 TCCAATGGGA TGGGAGCAAA AATGCAGGAT TCACGAGCGG AAAACCTTGG  
 TTCAAGGTCA ACCCAAATA CCAGGGAATC AATGCAGTAA GTCAAGTCAC  
 ACAACCCGAC TCAGTATTTA ACTATTATCG TCAGTTGATC AAGATAAGGC  
 ATGACATCCC GGCATGACC TATGGTACAT ACACCGATTT GGATCCTGCA  
 AATGATTCGG TCTACGCCTA TACACGCAGC CTTGGGGCGG AAAAATATCT  
 TGTGTGTGTT AACTTCAAGG AGCAAATGAT GAGATATAAA TTACCGGATA  
 ATTTATCCAT TGAGAAAGTG ATTATAGACA GCAACAGCAA AAACGTGGTG  
 AAAAAGAATG ATTCATTACT CGAGCTAAAA CCATGGCAGT CAGGAGTTTA  
 TAAACTAAAT CAATAA\*Stop

**Aminosäuren:**

MTMITPSFIE QSKTIPKWWK EAVFYQVYPR SFKDTNGDGI GDINGIIEKL  
 DYLKALGIDA IWINPHYDSP NTDNGYDIRD YRKIMKEYGT MEDFDRLISE  
 MKKRNMRMI DVVINHTSDQ HEWVQSKSS KDNPYRDYYF WRDGKDGQAP  
 NNYPSPFFGS AWQKDEKTNQ YYLHYFAKQQ PDLNWDNPKV RQDLYAMLRF  
 WLDKGVSGLR FDTVATYSKI PDFPNLTQQQ LKNFAAEYTK GPNIHRYVNE  
 MNKEVLSHYD IATAGEIFGV PLDQSIKFFD RRRDELNIAF TFDLIRLDRD  
 SDQRWRRKDW KLSQFRQIID NVDRTAGGYG WNAFFLDNHD NPRAVSHFGD  
 DRPQWREPSA KALATLTLTQ RATPFYIQGS ELGMTNYPFK AIDEFDDIEV  
 KGFVHVDYVET GKVKADEFLO NVRLTSRDNS RTPFQWDGSK NAGFTSGKPW  
 FKVNPNYQEI NAVSQVTQPD SVFNYYRQLI KIRHDIPALT YGTYTDLDPA  
 NDSVYAYTRS LGAEKYLVVV NFKEQMMRYK LPDNLSIEKV IIDSNSKNVV

KKNDLLELK PWQSGVYKLN Q\*Stop

**vollständige Nukleotidsequenz des *pall*-Gens aus JMSpal513:**

```

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTTCATCGAA CAGTCGAAAA CCATACCTAA
ATGGTGAAG GAGGCTGTTT TTTATCAGGT GTATCCGCGC TCCTTTAAAG
ACACCAACGG AGATGGCATC GGGGATATTA ACGGCATCAT AGAAAAATTA
GACTATCTAA AAGCCTTGGG GATTGATGCC ATTTGGATCA ACCCACATTA
TGATTCTCCG AACACGGATA ATGGTTACGA TATACGTGAT TATCGAAAAA
TCATGAAAGA ATATGGCACG ATGGAGGATT TTGACCGCCT GATTTCTGAA
ATGAAAAAAC GGAATATGCG GTTGATGATT GATGTGGTCA TCAACCACAC
CAGCGATCAA AACGAATGGT TTGTTAAAAG TAAAAGCAGT AAGGATAATC
CTTATCGCGG CTATTATTTT TGGAAAGATG CTAAAGAAGG GCAGGCGCCT
AATAATTACC CTTTATTCTT TGGTGGCTCG GCGTGGCAAA AAGATGAAAA
GACCAATCAA TACTACCTGC ACTATTTTGC TAAACAACAG CCTGACCTAA
ACTGGGATAA TCCCAAAGTC CGTCAAGATC TTTATGCAAT GTTACGTTTC
TGGTTAGATA AAGGCGTGTC TGGTTTACGT TTTGATACGG TAGCGACCTA
CTCAAAAATT CCGGATTTCC CAAATCTCAC CCAACAACAG CTGAAGAATT
TTGCAGCGGA GTATACCAAG GGCCCTAATA TTCATCGTTA CGTCAATGAA
ATGAATAAAG AGGTCTTGTC TCATTACGAC ATTGCGACTG CCGGTGAAAT
CTTTGGCGTA CCCTTGATC AATCGATAAA GTTCTTCGAT CCCCGCCGTG
ATGAGCTGAA CATTGCATTT ACCTTTGACT TAATCAGACT CGATCGAGAC
TCTGATCAAA GATGGCGTCG AAAAGATTGG AAATTGTCGC AATTCCGGCA
GATCATCGAT AACGTTGACC GTACTGCAGG AGAATATGGT TGGAATGCCT
TCTTCTTGGA TAACCACGAC AATCCGCGCG CTGTCTCGCA CTTTGGCGAT
GATCGCCAC AATGGCGTGA GCCATCGGCT AAAGCGCTTG CAACCTTGAC
GCTGACTCAA CGAGCAACAC CTTTTATTTA TCAAGGTTCA GAATTGGGCA
TGACCAATTA CCCGTTTAAA GCTATTGATG AATTCGATGA TATTGAGGTG
AAAGGTTTTT GGCATGACTA CGTTGAGACA GGAAAGGTCA AAGCCGACGA
GTTCTTGCAA AATGTACGCC TGACGAGCAG GGATAACAGC CGGACGCCGT
TCCAATGGGA TGGGAGCAAA AATGCAGGAT TCACGAGCGG AAAACCTTGG
TTCAAGGTCA ACCCAAATA CCAGGAAATC AATGCAGTAA GTCAAGTCAC
ACAACCCGAC TCAGTATTTA ACTATTATCG TCAGTTGATC AAGATAAGGC
ATGACATCCC GGCATGACC TATGGTACAT ACACCGATTT GGATCCTGCA
AATGATTCGG TCTACGCCTA TACACGCAGC CTTGGGGCGG AAAAATATCT
TGTTGTTGTT AACTTCAAGG AGCAAATGAT GAGATATAAA TTACCGGATA
ATTTATCCAT TGAGAAAGTG ATTATAGACA GCAACAGCAA AAACGTGGTG
AAAAAGAATG ATTCATTACT CGAGCTAAAA CCATGGCAGT CAGGAGTTTA
TAAACTAAAT CAATAA*Stop

```

**Aminosäuren:**

```

MTMITPSFIE QSKTIPKWWK EAVFYQVYPR SFKDTNGDGI GDINGIIEKL
DYLKALGIDA IWINPHYDSP NTDNGYDIRD YRKIMKEYGT MEDFDRLISE
MKKRNMRMI DVVINHTSDQ NEWFVKSSS KDNPYRGYYF WKDAKEGQAP
NNYPSFFGGS AWQKDEKTNQ YYLHYFAKQQ PDLNWDNPKV RQDLYAMLR
WLDKGVSGLR FDTVATYSKI PDFPNLTQQQ LKNFAAEYTK GPNIHRYVNE
MNKEVLSHYD IATAGEIFGV PLDQSIKFFD PRRDELNIAF TFDLIRLDRD
SDQRWRRKDW KLSQFRQIID NVDRTAGEYG WNAFFLDNHD NPRAVSHFGD
DRPQWREPSA KALATLTLTQ RATPFYIYQS ELGMTNYPFK AIDEFDDIEV
KGFWDHYVET GKVKADEFLLQ NVRLTSRDNS RTPFQWDGSK NAGFTSGKPW
FKVNPNYQEI NAVSQVTQPD SVFNYYRQLI KIRHDIPALT YGTYTDLDP
NDSVYAYTRS LGAEKYLVVV NFKEQMMRYK LPDNLSIEKV IIDSNSKNVV
KKNDLLELK PWQSGVYKLN Q*Stop

```

vollständige Nukleotidsequenz des *pall*-Gens aus JMSpalFIE:

```

ATGACCATGA TTACGCCAAG C1CAGTCGAAA ACCATACCTA AATGGTGGAA
GGAGGCTGTT TTTTATCAGG TGTATCCGCG CTCCTTTTAAA GACACCAACG
GAGATGGCAT CGGGGATATT AACGGCATCA TAGAAAAAATT AGACTATCTA
AAAGCCTTGG GGATTGATGC CATTGTGGATC AACCCACATT ATGATTCTCC
GAACACGGAT AATGGTTACG ATATACGTGA TTATCGAAAA ATCATGAAAG
AATATGGCAC GATGGAGGAT TTTGACCGCC TGATTTCTGA AATGAAAAAA
CGGAATATGC GGTGTGATGAT TGATGTGGTC ATCAACCACA CCAGCGATCA
AAACGAATGG TTTGTAAAAA GTAAAAGCAG TAAGGATAAT CCTTATCGCG
GCTATTATTT CTGGAAAGAT GCTAAAGAAG GGCAGGCGCC TAATAATTAC
CCTTCATTCT TTGGTGGCTC GGCGTGGCAA AAAGATGAAA AGACCAATCA
ATACTACCTG CACTATTTTG CTAAACAACA GCCTGACCTA AACTGGGATA
ATCCCAAAGT CCGTCAAGAT CTTTATGCAA TGTTACGTTT CTGGTTAGAT
AAAGGCGTGT CTGGTTTACG TTTTGATACG GTAGCGACCT ACTCAAAAAT
TCCGGATTTT CCAAATCTCA CCCAACAACA GCTGAAGAAT TTTGCAGCGG
AGTATACCAA GGGCCCTAAT ATTCATCGTT ACGTCAATGA AATGAATAAA
GAGGTCTTGT CTCATTACGA CATTGCGACT GCCGGTGAAA TCTTTGGCGT
ACCTTGGAT CAATCGATAA AGTTCTTCGA TCGCCGCCGT GATGAGCTGA
ACATTGCATT TACCTTTGAC TTAATCAGAC TCGATCGAGA CTCTGATCAA
AGATGGCGTC GAAAAGATTG GAAATTGTCG CAATTCCGGC AGATCATCGA
TAACGTTGAC CGTACTGCAG GAGAATATGG TTGGAATGCC TTCTTCTTGG
ATAACCACGA CAATCCGCGC GCTGTCTCGC ACTTTGGCGA TGATCGCCCA
CAATGGCGTG AGCCATCGGC TAAAGCGCTT GCAACCTTGA CGCTGACTCA
ACGAGCAACA CCTTTTATTT ATCAAGGTTT AGAATTGGGC ATGACCAATT
ACCCGTTTAA AGCTATTGAT GAATTCGATG ATATTGAGGT GAAAGGTTTT
TGGCATGACT ACGTTGAGAC AGGAAAGGTC AAAGCCGACG AGTTCTTGCA
AAATGTACGC CTGACGAGCA GGGATAACAG CCGGACGCCG TTCCAATGGG
ATGGGAGCAA AAATGCAGGA TTCACGAGCG GAAAACCTTG GTTCAAGGTC
AACCCTAACT ACCAGGAAAT CAATGCAGTA AGTCAAGTCA CACAACCCGA
CTCAGTATTT AACTATTATC GTCAGTTGAT CAAGATAAGG CATGACATCC
CGGCACTGAC CTATGGTACA TACACCGATT TGGATCCTGC AAATGATTCTG
GTCTACGCCT ATACACGCAG CCTTGGGGCG GAAAAATATC TTGTTGTTGT
TAACTTCAAG GAGCAAATGA TGAGATATAA ATTACCGGAT AATTTATCCA
TTGAGAAAGT GATTATAGAC AGCAACAGCA AAAACGTGGT GAAAAAGAAT
GATTCATTAC TCGAGCTAAA ACCATGGCAG TCAGGAGTTT ATAACTAAA
TCAATAA

```

## Aminosäuresequenz:

```

MTMITPS1QSK TIPKWWKEAV FYQVYPRSFK DTNGDGIGDI NGIIEKLDYL
KALGIDAIWI NPHYDSPNTD NGYDIRDYRK IMKEYGTMED FDRLISEMKK
RNMRLMIDVV INHTSDQNEW FVKSSSKDN PYRGYYFWKD AKEGQAPNNY
PSFFGGSAWQ KDEKTNQYYL HYFAKQQPDL NWDNPKVRQD LYAMLRFWLD
KGVSGLRFDV VATYSKIPDF PNLTQQQLKN FAAEYTKGPN IHRYVNEMNK
EVLSHYDIAT AGEIFGVPLD QSIKFFDRRR DELNIAFTFD LIRLDRSDQ
RWRRKDWKLS QFRQIIDNVD RTAGEYGWNA FFLDNHDNPR AVSHFGDDRP
QWREPSAKAL ATLTLTQRAT PFIYQGSELG MTNYPFKAID EFDDIEVKGF
WHDYVETGKV KADEFLLQNV LTSRDNSRTP FQWDGSKNAG FTSGKPWFKV
NPNYQEINAV SQVTQPDVSV NYRQLIKIR HDIPALTYGT YTDLPANDS
VYAYTRSLGA EKYLVVVNFK EQMMRYKLPD NLSIEKVIID SNSKNVVKKN
DSLLELKPWQ SGVYKLNQ*

```

vollständige Nukleotidsequenz des *pall*-Gens aus JMSpalSFI:

```

ATGACCATGA TTACGCCA↓GA ACAGTCGAAA ACCATACCTA AATGGTGGAA
GAGGCTGTTT TTTATCAGGT GTATCCGCGC TCCTTTAAAG ACACCAACGG
AGATGGCATC GGGGATATTA ACGGCATCAT AGAAAAATTA GACTATCTAA
AAGCCTTGGG GATTGATGCC ATTTGGATCA ACCCACATTA TGATTCTCCG
AACACGGATA ATGGTTACGA TATACGTGAT TATCGAAAAA TCATGAAAGA
ATATGGCACG ATGGAGGATT TTGACCGCCT GATTTCTGAA ATGAAAAAAC
GGAATATGCG GTTGATGATT GATGTGGTCA TCAACCACAC CAGCGATCAA
AACGAATGGT TTGTTAAAAG TAAAAGCAGT AAGGATAATC CTTATCGCGG
CTATTATTTT TGGAAAGATG CTAAAAGAAG GCAGGCGCCT AATAATTACC
CTTCATTCTT TGGTGGCTCG GCGTGGCAAA AAGATGAAAA GACCAATCAA
TACTACCTGC ACTATTTTGC TAAACAACAG CCTGACCTAA ACTGGGATAA
TCCCAAAGTC CGTCAAGATC TTTATGCAAT GTTACGTTTC TGGTTAGATA
AAGGCGTGTC TGGTTTACGT TTTGATACGG TAGCGACCTA CTCAAAAATT
CCGGAATTTCC CAAATCTCAC CCAACAACAG CTGAAGAATT TTGCAGCGGA
GTATACCAAG GGCCCTAATA TTCATCGTTA CGTCAATGAA ATGAATAAAG
AGGTCTTGTC TCATTACGAC ATTGCGACTG CCGGTGAAAT CTTTGGCGTA
CCCTTGATC AATCGATAAA GTTCTTCGAT CGCCGCCGTG ATGAGCTGAA
CATTGCATTT ACCTTTGACT TAATCAGACT CGATCGAGAC TCTGATCAAA
GATGGCGTCG AAAAGATTGG AAATTGTGCG AATTCCGGCA GATCATCGAT
AACGTTGACC GTACTGCAGG AGAATATGGT TGGAAATGCCT TCTTCTTGA
TAACCACGAC AATCCGCGCG CTGTCTCGCA CTTTGGCGAT GATGCCCACA
ATGGCGTGAG CCATCGGCTA AAGCGCTTGC AACCTTGACG CTGACTCAAC
GAGCAACACC TTTTATTTAT CAAGGTTTCA AATTGGGCAT GACCAATTAC
CCGTTTAAAG CTATTGATGA ATTCGATGAT ATTGAGGTGA AAGGTTTTTG
GCATGACTAC GTTGAGACAG GAAAGGTCAA AGCCGACGAG TTCTTGCAAA
ATGTACGCCT GACGAGCAGG GATAACAGCC GGACGCCGTT CCAATGGGAT
GGGAGCAAAA ATGCAGGATT CACGAGCGGA AAACCTTGGT TCAAGGTCAA
CCCAAACCTAC CAGGAAATCA ATGCAGTAAG TCAAGTCACA CAACCCGACT
CAGTATTTAA CTATTATCGT CAGTTGATCA AGATAAGGCA TGACATCCCG
GCACTGACCT ATGGTACATA CACCGATTTG GATCCTGCAA ATGATTCGGT
CTACGCCTAT ACACGCAGCC TTGGGGCGGA AAAATATCTT GTTGTTGTTA
ACTTCAAGGA GCAAATGATG AGATATAAAT TACCGGATAA TTTATCCATT
GAGAAAGTGA TTATAGACAG CAACAGCAAA AACGTGGTGA AAAAGAATGA
TTCATTACTC GAGCTAAAAC CATGGCAGTC AGGAGTTTAT AAATAAATC
AATAA*Stop

```

## Aminosäuren:

```

MTMITP↓EQSK TIPKWWKEAV FYQVYPRSEK DTNGDGIGDI NGIIEKLDYL
KALGIDAIWI NPHYDSPNTD NGYDIRDYRK IMKEYGTMED FDRLISEMKK
RNMRLMIDVV INHTSDQNEW FVSKSSKDN PYRGYFWKD AKEGQAPNNY
PSFFGGS AWQ KDEKTNQYYL HYFAKQQPDL NWDNPKVRQD LYAMLRFWLD
KGVSGLRFD T VATYSKIPDF PNLTQQQLKN FAAEYTKGPN IHRYVNEMNK
EVLSHYDIAT AGEIFGVPLD QSIKFFDRRR DELNIAFTFD LIRLDRDSDQ
RWRRKDWKLS QFRQIIDNVD RTAGEYGWNA FFLDNHDNPR AVSHFGDDR
QWREPSAKAL ATLTLTQRAT PFIYQGSELG MTNYPFKAID EFDDIEVKGF
WHDYVETGKV KADEFLLQNV L TSRDNSRTP FQWDGSKNAG FTSGKPWFKV
NPNYQEINAV SQVTQPDVSVF NYRQLIKIR HDIPALTYGT YTDLPANDS
VYAYTRSLGA EKYLVVVNFK EQMMRYKLPD NLSIEKVIID SNSKNVVKK
DSLLELKPWQ SGVYKLNQ*Stop

```

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des interessanten Themas und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen. Sein stetes Interesse an der Arbeit und seine vielen hilfreichen Anregungen haben wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Ich danke besonders Frau Dr. Milada Schubert für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, ihre vielfältigen Anregungen und hilfreichen Diskussionen.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Agrartechnologie des Johann von Thünen-Instituts Braunschweig für das nette Arbeitsklima, die vielseitigen Hilfestellungen, für die Diskussion der Ergebnisse und für die Motivation während der gesamten Arbeit. Mein Dank gilt insbesondere Frau Dipl.-Biotechnol. Anne Ringel, Frau Dr. Claudia Wilkens, Frau Diana Hortig, Frau Dipl.-Biotechnol. Katrin Riedmann, Herrn Dipl.-Biotechnol. Erik Wilkens, Herrn Dipl.-Biol. Hendrik Krauter und Herrn Denis Jäger.

Der Südzucker AG und dem BMELV danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für ihre große Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Für die Korrekturlesung der Arbeit bedanke ich mich bei Frau Rebecca Schütte und Frau Stefanie Baumert.

Schließlich möchte ich Herrn Björn Koch für seine Unterstützung, sein Verständnis und die unendliche Geduld danken.